

SORAYA SGAMBATTI DE ANDRADE

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES À OXACILINA ISOLADOS NA ARGENTINA,
BRASIL E CHILE NO PERÍODO DE 1997 A 2006**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
Obtenção do Título de Doutor em Medicina

São Paulo

2008

SORAYA SGAMBATTI DE ANDRADE

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES À OXACILINA ISOLADOS NA ARGENTINA,
BRASIL E CHILE NO PERÍODO DE 1997 A 2006**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
Obtenção do Título de Doutor em Medicina

Orientador:

Prof. Dr. Antônio C. Campos Pignatari

Co-Orientador:

Prof. Dr. Hélio Silva Sader

São Paulo

2008

ANDRADE, Soraya Sgambatti

Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados na Argentina, Brasil e Chile no período de 1997 a 2006 / Soraya Sgambatti de Andrade --- São Paulo, 2008.

xiv, 87 p

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Título em inglês: Molecular epidemiology of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Argentina, Brazil and Chile, during the 1997-2006 period.

1. *Staphylococcus aureus* 2. oxacilina 3. epidemiologia molecular

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Ricardo Sobie Diaz

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais durante todos os momentos da minha vida.

Obrigada pelo incentivo constante e por todas as oportunidades que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari, diretor do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), meus agradecimentos pela confiança depositada em meu trabalho, da residência médica à pós-graduação, e pela oportunidade de consolidar meus conhecimentos sob sua supervisão.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Hélio Silva Sader, por me proporcionar inúmeras oportunidades de crescimento profissional, incorporando o componente laboratorial em minha formação médica. Sua capacidade de liderança, competência e dinamismo são exemplos a serem seguidos. Muito obrigada por ter me proporcionado tamanha realização profissional.

À Prof. Dra. Ana Cristina Gales, diretora do Laboratório ALERTA, pelo exemplo de ética, caráter e dedicação, nos mostrando que é possível atuar com extrema competência nas áreas de assistência, ensino, e pesquisa. Agradeço o apoio constante, pessoal e profissional, em todas as etapas deste trabalho.

À equipe do JMI Laboratories, em especial ao Dr. Ronald N. Jones, pela oportunidade de desenvolver projetos em conjunto, especialmente com o Programa SENTRY. É um grande aprendizado trabalhar com um grupo tão produtivo.

À Fernanda Inoue, pós-graduanda do LEMC, pelo auxílio dispensado com muita presteza e competência durante a realização dos testes laboratoriais. Sua colaboração foi fundamental para este estudo.

À Jussimara Monteiro, pelo aporte na realização dos experimentos de PFGE. Obrigada pela dedicação neste projeto e pela amizade verdadeira.

À Andréa dos Santos Pereira, colega de pós-graduação, pela amizade duradoura, e pela generosidade em auxiliar todos os projetos do LEMC.

À Mírian, pós-doutora do LEMC, pelo auxílio na padronização dos testes e pelos ensinamentos compartilhados com os demais pós-graduandos, sempre com generosidade e paciência.

A todos os amigos do LEMC e ALERTA, pelo trabalho em equipe, e pela amizade e apoio constantes durante todos os momentos que compartilhamos.

Aos funcionários do IDIPA e LEMC, em especial à Rosana Capecce pelo trabalho e dedicação.

Aos professores da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, especialmente ao Dr. Ricardo Diaz, Dr. Arnaldo Lopes Colombo, Dr. Reinaldo Salomão, Dr. Sérgio Wey, Dr. Celso Granato, Dr. Adauto Castelo, Dr. Antonio Carlos Pires Pereira, meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Sérgio Tufik, pró-reitor da UNIFESP, pela confiança depositada em meu trabalho e pelo exemplo de motivação, liderança e empreendedorismo.

A todos da AFIP/Medicina Laboratorial, em especial à Vera Mendes, pela alegria de trabalharmos juntas e pela amizade verdadeira.

Aos professores da Universidade Federal de Goiás, que direta ou indiretamente ajudaram em meu crescimento profissional.

Aos meus queridos pais Ana Lúcia e João, e aos meus irmãos Sabrina e Marcel, pelo amor e carinho que nos une, mesmo à distância.

Ao meu marido Roberto, pelo amor, companheirismo e compreensão constantes, compartilhando com carinho este momento importante da minha vida. Sua presença foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Às amigas Patrícia Rady, Veruska Di Sena, Ana Cristina Amaral, e Bibiana Povinelli, pela amizade sincera e apoio em momentos marcantes da minha vida.

À minha família em Goiânia, em especial minha avó Helena, pela certeza do amor incondicional que nos une, apesar da distância.

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Epidemiologia	01
1.2. Disseminação de clones MRSA	10
1.3. Mecanismos de resistência à oxacilina	16
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Amostras bacterianas	24
3.2. Seleção das amostras para o estudo	27
3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>nuc</i>	29
3.4. PCR multiplex para determinação do tipo de <i>SCCmec</i>	30
3.5. Detecção do complexo gene <i>ccr</i>	37
3.6. E-test®	38
3.7. Reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>lukF</i> , codificador da PVL (Panton Valentine Leukocidin)	39
3.8. Análise do polimorfismo do DNA cromossômico	40
3.9. Análise dos dados	45
4. RESULTADOS	47
4.1. Distribuição das amostras MS-MRSA e MR-MRSA	47
4.2. Resultados da caracterização genética das amostras	48
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS	74
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização geográfica dos sete centros médicos na América do Sul participantes do presente estudo. Programa SENTRY na América Latina, 1997-2006 27
- Figura 2:** Gráfico-caixa da distribuição da idade dos pacientes (eixo Y) nos diferentes tipos de SCCmec (eixo X). A caixa representa o intervalo interquartilico que contém 50% dos valores (do percentil 75 ao 25). A linha horizontal dentro da caixa representa a mediana (percentil 50) da idade para cada tipo de SCCmec. A linha vertical que atravessa a caixa conecta os valores adjacentes superior (95%) e inferior (5%) da distribuição das idades 53
- Figura 3:** Perfil de bandas de amostras MRSA por técnica de eletroforese em campo pulsado. Canaleta 1: marcador de peso molecular 48,5kb (Lambda ladder); canaletas 2, 8 e 14: cepa padrão *Staphylococcus aureus* NCTC 8325; canaletas 3-7, 9-13, e 15-17: isolados MRSA SCCmec IV com mais de 80% de similaridade à cepa do clone pediátrico HDE 288 54
- Figura 4:** Perfil de bandas de amostras MRSA por técnica de eletroforese em campo pulsado. Canaletas 1 e 30: marcador de peso molecular 48,5kb (Lambda ladder); canaletas 2, 8, 14, 20 e 26: cepa padrão *Staphylococcus aureus* NCTC 8325; canaletas 3-7, 9-13, e 15-19, 21 a 23: isolados MRSA SCCmec I. Canaletas 24, 25 e 29: isolados MRSA SCCmec IV com mais de 80% de similaridade à cepa do clone pediátrico HDE288. Canaleta 28: isolado MRSA SCCmec IVc com perfil distinto do clone pediátrico 55
- Figura 5:** Perfil de bandas de amostras MRSA por técnica de eletroforese em campo pulsado. Canaletas 1 e 30: marcador de peso molecular 48,5kb (Lambda ladder); canaletas 2, 8, 14, 20 e 26: cepa padrão *Staphylococcus aureus* NCTC 8325; canaletas 3-7, 9-11, 13, 15-18, 21-25, 27-20: isolados MRSA SCCmec III com mais de 80% de similaridade à cepa do clone epidêmico brasileiro HU25. Canaleta 12: isolado MRSA SCCmec III com perfil distinto da cepa HU25 55
- Figura 6:** Análise de clusters das amostras contendo SCCmec I, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendograma correspondem, respectivamente, ao ano de isolamento, país e sítio de infecção de cada isolado bacteriano 57

Figura 7:	Tamanho (em kb) e posição das bandas de cepas representantes do clone Chile/Cordoba <i>SCCmec</i> I, e comparação com amostras do presente estudo. O cálculo do tamanho aproximado das bandas foi realizado pelo programa Bionumerics. Colunas 2 e 3: amostras <i>SCCmec</i> I pertencentes ao clone Chile/Cordoba (Figura 3 de(Sola et al. 2006)). Colunas 1, 4 e 5: amostras <i>SCCmec</i> I pertencentes ao cluster <i>SCCmec</i> I encontradas no presente estudo	58
Figura 8:	Análise de clusters das amostras contendo <i>SCCmec</i> IV, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendograma correspondem, respectivamente, ao tipo/subtipo de <i>SCCmec</i> , ano de isolamento, país e sítio de infecção de cada isolado bacteriano. As amostras com "*" são positivas para PVL	59
Figura 9:	Análise de clusters das amostras contendo <i>SCCmec</i> III, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. A figura 9a corresponde às amostras analisadas 1997 e 2001; a figura 9b corresponde às amostras analisadas entre 2002 e 2006. Os ramos colapsados (triângulo invertido) correspondem às amostras com mais de 80% de similaridade com o clone epidêmico brasileiro	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características dos seis tipos de cassete cromossômico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>) descritos até o momento	22
Tabela 2:	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCC <i>mec</i>	32
Tabela 3:	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCC <i>mec</i>	35
Tabela 4:	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas como controles no presente estudo	43
Tabela 5:	Distribuição dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina selecionados para testes moleculares dos perfis MS-MRSA e MR-MRSA	48
Tabela 6:	Resultados de SCC <i>mec</i> segundo protocolo de Milheiriço e colaboradores, para as amostras não tipáveis pelo protocolo de Zhang e colaboradores	50
Tabela 7:	Distribuição dos tipos de SCC <i>mec</i> , estratificados por país e perfil de sensibilidade	51
Tabela 8:	Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os perfis MS-MRSA e MR-MRSA em comparação aos resultados de SCC <i>mec</i>	52

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
BSAC	Bacteraemia Resistance Surveillance Programme
CA-MRSA	MRSA associados ou adquiridos na comunidade
CANCER	Aliança Quimioterápica para Neutropênicos e Controle de Resistência Emergente
CC	complexo clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEB	Clone epidêmico brasileiro
CIM	Concentração inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EUA	Estados Unidos da América
IC 95%	Intervalos de 95% de confiança
IRAS	Infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde
IS	Sequências de inserção
JMI	Jones Microbiology Institute
LEMC	Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
MLST	Multilocus sequence typing
MR-MRSA	Amostras MRSA multirresistentes
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS-MRSA	Amostras MRSA multisensíveis
NCTC	National Collection of Type Cultures
NISS	National Nosocomial Infection Surveillance System
NORSA	Non-nonmultiresistant MRSA
ORF	Open reading frame

ORSA	Oxacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
OSPC	Oceania South Pacific Clone
PAC	Pneumonias adquiridas na comunidade
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	eletroforese em campo pulsado
PVL	Panton-Valentine leucocidina
SCC _{mec}	cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
ST	sequence type
SWP	South West Pacific
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UPGMA	Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages
USA	United States of America
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
VISA	<i>S. aureus</i> com sensibilidade intermediária à vancomina
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
VRSA	<i>S. aureus</i> resistente à vancomicina
WA-MRSA	Western-Australia MRSA

RESUMO

Objetivos: (i) avaliar a distribuição dos tipos de *SCCmec* e frequência da leucocidina de Panton-Valentine (PVL) em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), coletados como parte de um programa de vigilância em sete centros médicos na Argentina, Brasil e Chile; (ii) avaliar a relação entre os tipos de *SCCmec* e perfis de sensibilidade a antimicrobianos; (iii) caracterizar os clones de MRSA predominantes nestes centros médicos, utilizando a técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). **Material e Métodos:** Foram incluídos todos os isolados MRSA dos sete centros médicos, coletados como parte do Programa SENTRY na América Latina no período 1997-2006. As amostras foram estratificadas em dois subgrupos, de acordo com a sensibilidade *in vitro* a agentes não β -lactâmicos: multissensível (MS-MRSA) e multirresistente (MR-MRSA). Amostras representativas de cada subgrupo, selecionadas de acordo com o ano e país de isolamento, foram submetidas a testes fenotípicos e genotípicos adicionais. Os tipos de *SCCmec* foram caracterizados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, seguidos da pesquisa do complexo *ccr* e PVL, caso pertinente. Os tipos clonais foram investigados por PFGE. As características demográficas dos pacientes infectados foram analisadas de acordo com cada subgrupo de *SCCmec*. **Resultados:** Foram avaliados 56 isolados de MS-MRSA e 141 de MR-MRSA. A maioria de amostras MS-MRSA carregavam *SCCmec* I (35,7%) ou IV (46,4%); por outro lado, o tipo III predominou no subgrupo MR-MRSA. A maioria de *SCCmec* I foi detectado na Argentina (n=5) e Chile (n=14). A maioria das 26 amostras tipo IV foram identificadas no Brasil (n=20), apenas cinco foram positivas para PVL, e a média da concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina foi de 45,1 μ g/ml. O dendograma obtido pelo perfil de bandas de PFGE classificou as amostras em três grupos distintos: clone brasileiro epidêmico (*SCCmec* III), clone pediátrico (*SCCmec* IV), e uma linhagem possivelmente relacionada ao clone Chile/Córdoba (*SCCmec* I). **Conclusões:** A coleção de MRSA avaliada continha uma grande diversidade de tipos de *SCCmec* e linhagens clonais. Os perfis de sensibilidade (MS-MRSA e MR-MRSA) correlacionaram-se bem aos tipos de *SCCmec* nas diferentes regiões geográficas avaliadas.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

1.1.1. Programas de Vigilância Bacteriana

Informações sobre a frequência de *Staphylococcus aureus* como causador de infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm sido geradas por programas mundiais de vigilância de resistência antimicrobiana. Estes programas coletam, analisam e disseminam dados referentes a um grande número de patógenos obtidos de diferentes sítios de infecção. Alguns destes programas avaliam prospectivamente o cenário epidemiológico local com a finalidade de detectar mudanças na prevalência e/ou perfil de sensibilidade de determinado agente bacteriano. Estes programas adicionam informações importantes sobre mecanismos específicos de resistência e avaliam o potencial de disseminação destes patógenos resistentes, local e globalmente (Felmingham 2002; Jones and Masterton 2001; Masterton 2000).

Dentre os programas de vigilância que monitoram infecções por *S. aureus*, destacam-se o Programa SENTRY (Diekema et al. 2001), o Consórcio Internacional de Controle de Infecção ("International Nosocomial Infection Control Consortium") (Rosenthal et al. 2006), o Programa CANCER - Aliança Quimioterápica para Neutropênicos e Controle de Resistência Emergente - ("*Chemotherapy Alliance for Neutropenics and the Control of Emerging Resistance*") (Kirby et al. 2006), o Programa EARSS ("European Antimicrobial Resistance Surveillance System") (European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2006) e o "BSAC - Bacteraemia Resistance Surveillance Programme" (Reynolds et al. 2004). Enquanto

alguns destes programas coletam e processam somente dados epidemiológicos referentes a infecções por *S. aureus*, outros estudam também os isolados bacterianos, determinando suas características fenotípicas e genotípicas e relacionando-as com seus respectivos dados demográficos.

1.1.2. Infecções relacionadas à assistência à saúde

Resultados iniciais de vigilância do Programa SENTRY mostraram que *S. aureus* foi o agente mais freqüentemente isolado de infecções de corrente sanguínea e pele e tecidos moles em centros médicos latino-americanos e da América do Norte (Diekema et al. 2002; Hoban et al. 2003; Rennie et al. 2003) (Sader et al. 2002b; Sader et al. 2002a). Dados mais recentes deste estudo mostram que *S. aureus* continua sendo um dos principais agentes causadores de IRAS, independente do período analisado, e o principal patógeno isolado de infecções de pele e tecidos moles em centros médicos localizados na América do Norte, América Latina e Europa, entre os anos de 1998 a 2004 (Moet et al. 2007).

O Consórcio Internacional de Controle de Infecção foi estabelecido para estudar a freqüência de IRAS em centros médicos de oito países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (Rosenthal et al. 2006). Inicialmente, o projeto avaliou as características de IRAS em pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) nos anos de 2002 a 2005. Utilizando-se os critérios do estudo de vigilância NISS ("National Nosocomial Infection Surveillance System"), verificou-se que *S. aureus* foi o segundo e terceiro agente mais prevalente em pacientes acometidos por infecções associadas à utilização de cateter venoso central e ventilação mecânica, respectivamente (Rosenthal et al. 2006). Os mesmos critérios do Consórcio Internacional de Controle de Infecção foram aplicados em dez unidades de terapia

intensiva da Colômbia, entre os anos de 2002-2005, mostrando que *S. aureus* foi o principal agente de infecções associadas ao uso de cateteres venosos (Moreno et al. 2006).

Infecções por *S. aureus* são também prevalentes em imunossuprimidos e crianças, como observado pelo Programa CANCER - Aliança Quimioterápica para Neutropênicos e Controle de Resistência Emergente - ("Chemotherapy Alliance for Neutropenics and the Control of Emerging Resistance"), no qual *S. aureus* foi detectado em 19,3% dos pacientes em centros médicos oncológicos e de hemoterapia (Kirby et al. 2006).

Isolados de *S. aureus* com resistência *in vitro* ao antimicrobiano oxacilina ou cefoxitina são denominados ORSA ("oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*") ou MRSA ("methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*"). Estes patógenos são geralmente introduzidos no ambiente hospitalar por profissionais de saúde ou pacientes infectados ou colonizados por este agente. Pressão seletiva por exposição prévia a determinados antimicrobianos parece ser um dos principais fatores de risco associados à aquisição deste patógeno resistente (Tacconelli et al. 2008). Outros fatores de risco associados à colonização ou infecção por MRSA incluem admissão em unidades de terapia intensiva (UTI), presença de co-morbidades, realização de procedimentos cirúrgicos, e contato com indivíduos colonizados por MRSA (Graffunder and Venezia 2002; Skiest et al. 2007).

Paralelamente às elevadas freqüências de infecções por *S. aureus*, taxas crescentes de MRSA têm sido mundialmente relatadas desde 1961, quando foi descrito o primeiro isolado clínico resistente à oxacilina (Jevons MP 1961). Variações na freqüência de *S. aureus* resistentes à oxacilina relacionados às IRAS dependem diretamente do sítio de infecção, da unidade de internação, e da região geográfica em

estudo. Nos Estados Unidos, de acordo com dados de vigilância do estudo NNIS, a prevalência de infecções por este patógeno resistente aumentou de 35.9% em 1992 para 64.4% em 2003. Estes valores representaram um aumento de aproximadamente 3% ao ano nas taxas de infecções por MRSA, em pacientes admitidos em UTIs adulto e pediátrica dos centros médicos colaboradores. Este aumento do relato de isolados clínicos de MRSA ocorreu concomitante à diminuição das taxas de resistência a outros antimicrobianos não β -lactâmicos, tais como clindamicina, gentamicina, e tetraciclina (Klevens et al. 2006a; NNIS 2004). Taxas crescentes de resistência à oxacilina em amostras relacionadas às IRAS têm sido descritas também em outras regiões desenvolvidas, como Reino Unido e Alemanha (Johnson et al. 2005; Meyer et al. 2006). Em alguns países do Reino Unido, as taxas de bacteremia por MRSA aumentaram consideravelmente em relação ao total de *S. aureus* avaliados, de 2% na década de 90 para mais de 40% em 2003 (Johnson et al. 2005). Estes dados de IRAS são corroborados por alguns programas de vigilância bacteriana europeus, como o EARSS e o BSAC (European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2006; Reynolds et al. 2004).

Na América Latina, a exigüidade de estudos prospectivos de vigilância limita a obtenção da estimativa da prevalência de MRSA em várias regiões geográficas. Na Argentina, resultado de vigilância realizada em 27 centros médicos detectou 58% de resistência à oxacilina entre amostras coletadas entre 1996 e 1998 (Bantar et al. 2000). Altas taxas de infecções por MRSA foram identificadas pelo Consórcio Internacional de Controle de Infecção em oito países em desenvolvimento, nos quais o percentual de MRSA em pacientes admitidos em UTIs com pneumonia ou com infecções relacionadas a dispositivos invasivos foi de aproximadamente 85% (Rosenthal et al. 2006). Apesar de este estudo ter recrutado centros médicos em quatro

países da América Latina (Argentina, Brasil, Colômbia e Peru), os resultados não foram apresentados por país (à exceção da Colômbia), impossibilitando o conhecimento da prevalência de MRSA em cada região. Estudo adicional deste consórcio, analisando somente os dados obtidos nas dez UTIs colombianas, observou 65,4% de isolados MRSA (Moreno et al. 2006).

Dados de 1997 a 2001 do Programa SENTRY nos países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, México, Uruguai e Venezuela) referentes a 3.396 isolados de *S. aureus* recuperados de diversos sítios de infecção revelaram altas taxas de MRSA. (Sader et al. 2004). Ao se agrupar resultados dos cinco anos em conjunto, a frequência de sensibilidade à oxacilina foi semelhante entre as amostras recuperadas na América Latina (63,2%) e no Brasil (62,7%). No último ano analisado, verificou-se um decréscimo significativo nas taxas de sensibilidade à oxacilina para aproximadamente 56% nos centros brasileiros e latino-americanos.

Além de expressarem resistência *in vitro* à oxacilina, isolados clínicos de MRSA provenientes de ambientes hospitalares freqüentemente expressam resistência a outros agentes não β -lactâmicos. Em um hospital espanhol, entre 1996-2000, as maiores taxas de co-resistência foram detectadas para ciprofloxacina (98,1%), eritromicina (98,1%) e clindamicina (97,9%) (Monnet et al. 2004). Menos de 11% do total de MRSA expressavam fenótipo de resistência a gentamicina, rifampicina, tetraciclina, e sulfametoxazol-trimetoprima.

Esta co-resistência para MRSA foi observada também pelo Programa SENTRY, em isolados coletados entre 1997-1999 (Diekema et al. 2002). Nos Estados Unidos, as maiores taxas de co-resistência foram verificadas para eritromicina (92,7%), ciprofloxacina (88,6%) e clindamicina (79,2%). Os centros latino-americanos apresentaram taxas ainda mais elevadas à eritromicina (93,0%), ciprofloxacina (89,6%)

e clindamicina (88,0%), além de 91,2% e 65,4% de resistência, respectivamente, à gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprima. Enquanto isolados de MRSA da América Latina apresentaram, em média, resistência a seis classes de agentes não β -lactâmicos, amostras de outras regiões expressaram resistência a cinco (Europa e Pacífico) ou a apenas três classes (América do Norte). Rifampicina (23,4%) e cloranfenicol (57,9%) apresentaram as menores freqüências de co-resistência entre os MRSA detectados na América Latina. Apesar de este estudo ter documentado altas taxas de co-resistência a não β -lactâmicos no final da década de 90, análises recentes de combinações destes fenótipos não foram disponibilizadas por estudos de vigilância na América Latina.

1.1.3. Infecções comunitárias

Além de representar um dos principais patógenos responsáveis por bacteremias associadas às IRAS, *S. aureus* é também isolado em hemoculturas de pacientes provenientes da comunidade. Em uma instituição canadense, 14% de todas as hemoculturas com crescimento bacteriano coletadas de pacientes ambulatoriais foram causadas por este agente (Laupland et al. 2005). Estudo conduzido em hospital espanhol revelou que 15% dos isolados bacterianos de pacientes com bacteremias primárias adquiridas na comunidade eram *S. aureus* (Ortega et al. 2007). Em alguns países em desenvolvimento, *S. aureus* encontra-se entre os principais agentes causadores de bacteremias adquiridas na comunidade, como Turquia (14,6%) e Laos (19,9%) (Esel et al. 2003; Phetsouvanh et al. 2006).

S. aureus é também um dos principais agentes isolados de pacientes com infecções de pele e subcutâneo adquiridas na comunidade, incluindo impetigos, celulites e erisipelas (Bonness et al. 2007; Krasagakis et al. 2006; Manfredi et al. 2002).

Recentemente, a freqüência deste patógeno como causador de pneumonias adquiridas na comunidade (PAC) tem aumentado em algumas regiões geográficas (Kollef and Micek 2005). Estudo recente nos Estados Unidos avaliando 208 pacientes com PAC mostrou que *S. aureus* foi o segundo agente mais freqüente, detectado em um quarto dos casos de pneumonia (Micek et al. 2007). Na América Latina, apesar da publicação de relatos de casos, há escassez de dados de programas de vigilância indicando a real prevalência de *S. aureus* como patógeno em infecções de pele, pneumonias e bacteremias adquiridas na comunidade.

Mais recentemente, infecções por MRSA foram detectadas em pacientes provenientes da comunidade, muitos dos quais não exibiam histórico de hospitalização recente, e foram denominados CA-MRSA (MRSA associados ou adquiridos na comunidade). Estes isolados foram recuperados de diversos sítios de infecção ou colonização, freqüentemente associados a surtos esporádicos em populações específicas, tais como crianças, pacientes imunossuprimidos, indivíduos encarcerados, e participantes de esportes coletivos (Clin. Infect. Dis. 2006; Nguyen et al. 2005; Pan et al. 2003; Thompson and Torriani 2006; Wang et al. 2004).

Atualmente, não há uma definição única e globalmente adotada que identifique com precisão determinado isolado como CA-MRSA; a maioria dos estudos publicados utilizam critérios heterogêneos para a classificação destas infecções como comunitárias (Salgado et al. 2003). Assim, múltiplas definições para CA-MRSA têm sido propostas, baseadas em informações epidemiológicas e clínicas dos pacientes, e/ou em características laboratoriais do isolado em questão (Kluytmans-Vandenbergh and Kluytmans 2006). A ausência de um critério único e claro para definição de CA-MRSA pode levar a estimativas de prevalências distintas em uma mesma população, dependendo dos critérios adotados pelos pesquisadores (Folden et al. 2005).

Epidemiologicamente, isolados clínicos de MRSA são definidos como CA-MRSA se houverem sido coletados de pacientes ambulatoriais, ou coletados até 48 horas após admissão hospitalar. Adicionalmente, devem-se excluir fatores de risco para IRAS, tais como hospitalização ou intervenções cirúrgicas recentes, presença de catéter venoso ou dispositivos intravasculares e cutâneos de longa permanência, e residência em instituições de saúde (Department of Health and Human Services 2005; Salgado et al. 2003). Alguns estudos consideram as definições clínico-epidemiológicas insuficientes para a correta caracterização das infecções como CA-MRSA, argumentando que pacientes previamente hospitalizados teriam maior risco de colonização ou infecção por um patógeno comunitário verdadeiro (Folden et al. 2005; Salgado et al. 2003). Os recentes relatos de isolados clínicos de CA-MRSA disseminados em hospitais corroborariam esta hipótese, o que indicaria uma provável subestimativa do número de casos de CA-MRSA (Klevens et al. 2006b; Maree et al. 2007; Ribeiro et al. 2007; Takano et al. 2007; Tambyah et al. 2003).

Além dos critérios epidemiológicos, CA-MRSA são também definidos pelas características microbiológicas do isolado em questão, utilizando-se testes fenotípicos ou genotípicos. As técnicas baseadas em epidemiologia molecular têm sido consideradas por alguns autores como imprescindíveis para definição de determinado isolado como CA-MRSA (Kluytmans-Vandenbergh and Kluytmans 2006; Shopsin et al. 2003).

Salgado e colaboradores conduziram estudo de meta-análise para avaliar a prevalência de CA-MRSA em isolados hospitalares (Salgado et al. 2003). Somente definições epidemiológicas foram utilizadas para definição de CA-MRSA. As taxas de prevalência variaram de acordo com o desenho original dos 32 estudos analisados, de 30,2% (estudos retrospectivos) a 37,3% (estudos prospectivos).

Nenhum destes estudos, entretanto, contemplava dados de CA-MRSA obtidos de hospitais latino-americanos. Nesta região, poucos estudos analisaram a prevalência de infecções CA-MRSA, utilizando-se de critérios epidemiológicos. Um dos poucos estudos conduzidos na América Latina revelou que 10% de todos os isolados de MRSA coletados de seis hospitais em Córdoba, Argentina, foram recuperados de pacientes ambulatoriais (Sola et al. 2002).

Em um hospital universitário de Brasília, estudo de vigilância avaliou a presença de *S. aureus* como agente colonizador de narinas de pacientes atendidos no pronto-socorro. Apenas um isolado de CA-MRSA foi detectado dentre 145 amostras de *S. aureus* identificadas no ano de 1997 (Ribeiro et al. 2005b). Na cidade de Goiânia, o estudo de vigilância de portador nasofaringe coletou swabs de crianças menores de 5 anos em até 48 horas da admissão hospitalar, detectando 7 cepas de MRSA, resultando em taxa de prevalência de 1% de MRSA nesta população (Lamaro-Cardoso et al. 2007).

Além dos estudos de vigilância supracitados, que avaliaram a presença de MRSA como agente colonizante, alguns autores brasileiros verificaram também a presença de CA-MRSA em amostras relacionadas às infecções. Nenhum isolado clínico de MRSA recuperado em hospital universitário do Rio de Janeiro, entre setembro de 1999 a junho de 2000, preenchia critérios epidemiológicos para CA-MRSA (Vivoni et al. 2006). Estudo conduzido no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo analisou e classificou epidemiologicamente isolados de MRSA obtidos de hemoculturas. Dentre as 151 amostras analisadas nos anos de 2002 e 2003, nenhuma se encaixava nos critérios definidos pelo estudo para CA-MRSA (Trindade et al. 2005).

1.2. Disseminação de clones MRSA

Cinco linhagens principais de *S. aureus* resistentes à oxacilina foram descritas inicialmente. Estas linhagens foram denominadas de clones epidêmicos pela habilidade de causar infecções, persistir localmente, e se disseminar através de distintas regiões geográficas, inclusive entre continentes. A denominação destes cinco clones epidêmicos de MRSA reflete a região na qual eles foram inicialmente identificados, ou indicam alguma propriedade epidemiológica característica de determinada linhagem. Por meio da utilização de técnicas moleculares, incluindo eletroforese em campo pulsado (PFGE), estes clones foram classificados como ibérico, epidêmico brasileiro (CEB), húngaro, Nova Iorque/Japão, e pediátrico epidêmico (Oliveira et al. 2002).

Alguns destes clones internacionais possuem também características fenotípicas refletidas em seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Uma coleção de amostras destas cinco linhagens foi testada *in vitro* para diversos antimicrobianos não β -lactâmicos, tais como clindamicina, eritromicina, espectinomicina, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. À exceção do clone pediátrico, as demais linhagens apresentaram-se resistentes à maioria dos agentes testados. Os clones ibérico, húngaro e Nova Iorque/Japão foram sensíveis somente a sulfametoxazol-trimetoprima, enquanto o clone brasileiro apresentou sensibilidade somente à espectinomicina. O clone pediátrico, por sua vez, apresentou resistência somente à gentamicina, e, em algumas amostras, à eritromicina (Oliveira et al. 2002).

Os primeiros representantes do clone ibérico foram identificados em 1989, relacionados a um surto epidêmico em um hospital em Barcelona, Espanha (Dominguez et al. 1994). Atualmente, este clone está disseminado em vários países da Europa, incluindo Portugal, Itália, e Polônia (Oliveira et al. 2001; Oliveira et al. 2002). A

partir de 1993, o clone Ibérico foi sendo paulatinamente substituído em vários hospitais da Espanha e de Portugal por outras linhagens clonais, incluindo representantes do CEB (Amorim et al. 2002) e clones MRSA fenotipicamente menos resistentes (Cuevas et al. 2007; Vindel et al. 2006).

O clone Nova Iorque/Japão foi descrito inicialmente em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque e em algumas regiões adjacentes, sendo também identificado na mesma época em um hospital em Tóquio, Japão (Aires de et al. 2000; Roberts et al. 1998; Roberts et al. 2000). Este clone foi recentemente documentado infectando pacientes no México e Hungria, substituindo outras linhagens locais ou internacionais de MRSA previamente dominantes (Conceicao et al. 2007; Velazquez-Meza et al. 2004). Atualmente, este clone multirresistente é considerado predominante nos casos de infecções associadas à assistência à saúde nos Estados Unidos. Adicionalmente, a maioria das amostras de *S. aureus* com sensibilidade intermediária à vancomina (VISA) e as amostras resistentes à vancomicina (VRSA) descritas até o momento nos Estados Unidos apresentam o mesmo perfil genotípico deste clone epidêmico. A amostra VISA Mu50 do Japão e Coreia também são descendentes desta mesma linhagem de MRSA (McDougal et al. 2003). No Brasil, apenas um isolado similar ao clone Nova Iorque/Japão foi registrado até o momento, colonizando um paciente em hospital no Rio de Janeiro no ano de 2005 (de Miranda et al. 2007).

O clone Brasileiro foi identificado inicialmente em 1993, na cidade de São Paulo, Brasil, e desde então representantes do CEB foram documentados nos cinco continentes. Na América do Sul, altas prevalências do mesmo foram relatadas em centros médicos da Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, associado às IRAS (Oliveira et al. 2002; Sader et al. 1994; Teixeira et al. 1995). Os primeiros estudos que identificaram este clone multirresistente no Brasil já documentavam uma predominância

significativa do mesmo entre as amostras MRSA genotipadas. Em 1995, Teixeira e colaboradores demonstraram a presença e disseminação do mesmo em cinco cidades brasileiras: São Paulo, Rio de Janeiro, Niterói, Porto Alegre e Manaus. Neste estudo, o CEB pôde ser identificado em 77% de todas as amostras de MRSA isoladas de vários sítios de infecção, coletadas no início da década de 90 (Teixeira et al. 1995).

A predominância do CEB no Brasil foi corroborada por relatos adicionais, com alta freqüência do mesmo em vários hospitais brasileiros. Estudo conduzido com amostras de MRSA coletadas entre 1995 e 1997, provenientes de 19 cidades no país, revelou que 80,3% das mesmas apresentou padrão idêntico ao clone brasileiro (Oliveira et al. 2001). Taxas ainda maiores deste clone (97%) foram detectadas em seis hospitais do Estado de São Paulo, entre 1996 e 1998 (Aires de Sousa M. et al. 2001) e em um hospital do Rio de Janeiro, entre 1999 e 2000 (Vivoni et al. 2006).

Apesar da predominância deste clone na década de 90, relatos recentes têm sugerido a substituição do CEB por outras linhagens clonais em alguns centros médicos, principalmente na Europa. Em hospitais da República Tcheca o CEB foi recentemente substituído por outro clone local, também multirresistente (Melter et al. 2003). Em Portugal, a freqüência deste clone entre isolados clínicos de MRSA em pacientes hospitalizados declinou de 69% em 1996-2000 para apenas 12% em 2003-2005 (Amorim et al. 2007). Na América Latina, apenas um estudo recente na Argentina foi especificamente desenhado para avaliar tendências na freqüência de clones internacionais em diferentes décadas. Este estudo também detectou a emergência e predominância de um clone local de MRSA, em detrimento de representantes do CEB (Sola et al. 2006).

As primeiras amostras representantes do clone pediátrico foram identificadas em 1992 em Portugal, recebendo esta denominação por terem sido isoladas em instituições que atendiam principalmente crianças (Sa-Leao et al. 1999). Surpreendentemente, o padrão de resistência de quase metade das amostras de MRSA de um dos hospitais pediátricos portugueses era limitado aos β -lactâmicos, sendo a maioria das amostras sensíveis a antimicrobianos de outras classes, como clindamicina, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, e sulfametoxazol-trimetoprima. Algumas destas cepas apresentavam heterorresistência à oxacilina pela técnica de difusão em disco, além de menores valores de CIMs para este antimicrobiano, variando entre 1,5 a 6 $\mu\text{g/ml}$.

Ao se comparar perfis moleculares armazenados em um banco de dados internacional, verificou-se que várias amostras isoladas previamente na Argentina (1994-1998), Colômbia (1996), Nova Iorque (1988-1991) e Polônia (1990-1996) possuíam genótipos idênticos entre si e às amostras do clone pediátrico (Oliveira et al. 2002; Sa-Leao et al. 1999). Semelhante ao descrito em Portugal, os representantes clonais destas outras 4 regiões foram recuperados predominantemente de crianças.

Os poucos estudos que descreveram a presença do clone pediátrico no Brasil estão em sua maioria associados a amostras de MRSA causadoras de colonização, e não de infecção. Seis isolados de MRSA colonizantes nasais, inicialmente considerados semelhantes ao clone Nova Iorque/Japão e posteriormente re-classificados como pertencentes ao clone pediátrico, foram identificados por pesquisadores brasileiros no Rio de Janeiro. Infelizmente, os autores não mencionaram na publicação o período no qual foram coletados os swabs nasais, impossibilitando determinar a data de origem dos isolados do clone pediátrico. Outros dados demográficos, como sexo e idade não foram também disponibilizados (Melo et al. 2004).

Nessa mesma cidade brasileira, foram isoladas três amostras representantes do clone pediátrico, provenientes de cuidadores de pacientes em atendimento médico domiciliar. Estas amostras foram coletadas no ano de 2001, como parte de estudo de vigilância para detectar possível colonização nasal por MRSA nestes pacientes e seus cuidadores. Semelhante às amostras descritas em 2004 por Melo e colaboradores, os três isolados apresentavam perfis fenotípico e genotípico idênticos, sendo sensíveis à ciprofloxacina, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina, mupirocin, rifampicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima (Rozenbaum et al. 2006). Oito amostras da mesma linhagem do clone pediátrico foram documentadas também em Recife (2002 e 2003) e no Rio de Janeiro (2005), provenientes de pacientes infectados ou colonizados por este patógeno. Apesar de serem sensíveis à maioria dos agentes não β -lactâmicos, algumas destas amostras exibiam resistência *in vitro* à eritromicina e/ou clindamicina (de Miranda et al. 2007).

Como tentativa de estabelecer e unificar uma base de dados molecular local, pesquisadores do CDC ("Centers for Disease Control and Prevention") analisaram várias amostras de MRSA coletadas nos Estados Unidos, comparando-as com diversas linhagens detectadas em outros países (McDougal et al. 2003). Foram encontrados padrões de PFGE semelhantes aos dos clones mundiais supracitados, e os mesmos foram reclassificados de acordo com a nova nomenclatura: USA100 (clone Nova Iorque/Japão), USA200 (E-MRSA - 16), USA500 (clone ibérico) e USA800 (clone pediátrico). Os clones E-MRSA - 15 e CEB não foram encontrados nesta coleção de isolados, não recebendo, portanto, denominação específica. Duas linhagens distintas, classicamente reportadas como causadoras de infecções comunitárias nos Estados Unidos, foram classificadas como USA300 e USA400.

Além dos clones internacionais epidêmicos, outras linhagens genotípicas têm sido descritas localmente, responsáveis muitas vezes pela substituição dos outrora prevalentes clones internacionais. Na América do Sul destaca-se um clone denominado "Chile/Córdoba", descrito inicialmente no Chile em isolados clínicos de MRSA recuperados em 1997-1998 (Aires de Sousa M. et al. 2001). A maioria destes isolados mostrava resistência *in vitro* à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e gentamicina. Amostras deste clone foram posteriormente documentadas na cidade de Córdoba, Argentina, tendo sido responsáveis pela eventual substituição do CEB nos hospitais avaliados (Sola et al. 2006; Sola et al. 2002). Na cidade de Assunção, Paraguai, estudo recente indicou predominância deste clone entre MRSA isolados em pacientes hospitalizados, enquanto somente 20% das amostras de IRAS foram identificadas como pertencentes ao CEB (Mayor et al. 2007).

No continente australiano, alguns clones locais de CA-MRSA foram identificados desde a década de 90, recebendo denominações de acordo com a região geográfica na qual foram isolados. O primeiro clone de CA-MRSA foi inicialmente detectado em populações indígenas em comunidades remotas e apresentava sensibilidade a vários agentes não β -lactâmicos, sendo denominado WA-MRSA ("Western-Australia" MRSA) (Udo et al. 1993). Subsequentemente, outro clone foi detectado em várias estados australianos e na Nova Zelândia, sendo classificado como SWP - "South West Pacific" (Nimmo et al. 2000). Um terceiro clone foi identificado em 2000, causando infecções comunitárias em pacientes de origem caucasiana na região australiana de Queensland (Munckhof et al. 2003). Na América Latina, representantes de um dos clones australianos foram identificados em dois países. No Uruguai, um aumento do número de casos de infecções de pele em pacientes da comunidade foi caracterizado como surto e atribuído à disseminação do clone SPW entre os pacientes

infectados (Ma et al. 2005). No Brasil, os primeiros isolados caracterizados genotipicamente como CA-MRSA estavam relacionados ao clone SWP, também denominado OSPC ("Oceania South Pacific Clone") pelos autores brasileiros (Ribeiro et al. 2005a; Ribeiro et al. 2007).

1.3. Mecanismos de resistência à oxacilina

Os antimicrobianos β -lactâmicos agem por meio da inibição de enzimas que catalizam a reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptideoglicano, constituintes da parede celular. Por possuírem alta afinidade e serem o sítio de ação das penicilinas, estas enzimas foram denominadas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Os *S. aureus* possuem normalmente quatro PBPs, e se tornam resistentes aos β -lactâmicos pela produção de uma PBP adicional, denominada PBP2a ou PBP2', uma proteína de 78-kDa. Esta nova PBP é capaz de substituir a função das demais PBPs bacterianas, permitindo a reação de transpeptidação, possuindo, entretanto, baixa afinidade pelos compostos β -lactâmicos (Chambers 1997; Lowy 2003).

A codificação destas novas PBPs, tornando estes patógenos resistentes à oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de MRSA. Este gene é parte integrante de um elemento genômico designado "cassete cromossômico estafilocócico *mec*" (SCC*mec*), integrado ao cromossomo de *S. aureus* na extremidade 3' de uma ORF ("open reading frame") de função não definida, denominada *orfX* (Katayama et al. 2000). Este elemento é composto do complexo do gene *mec*, que codifica resistência à oxacilina, e do complexo do gene *ccr*, que codifica recombinases responsáveis pela sua mobilidade. O restante do material genético do SCC*mec* é denominado região J

(do inglês "junkyard"). Apesar da região J não possuir função totalmente definida, a composição genética da mesma é utilizada como alvo para classificar SCC*mec* em subtipos.

O complexo do gene *mec* compreende às seguintes estruturas: (i) IS431, (ii) o gene *mecA* e (iii) seus reguladores, *mecI* e *mecRI*. O gene *mecI* codifica a proteína Mecl, reprimindo a transcrição do *mecA*. O gene *mecRI* codifica uma proteína transmembrana, que, na presença de compostos β -lactâmicos, induz à transcrição do gene *mecA* e subsequente produção de PBP2a. Os genes *mecI* e *mecRI* podem ser truncados pelas sequências de inserção IS431 e IS1272, levando à desrepressão do gene *mecA* (Ito et al. 2001).

Seis diferentes tipos de SCC*mec* foram caracterizados até o momento, diferenciando-se em tamanho e em composição genética. Estes elementos móveis podem conter genes que codificam resistência para agentes antimicrobianos não β -lactâmicos, relacionados à aquisição de transposons e plasmídeos pelo cromossomo bacteriano. SCC*mec* tipos I (34,3 kb), IV e VI (20,9-24,3 kb) e V (28 kb) codificam exclusivamente resistência aos β -lactâmicos. SCC*mec* tipo II (53,0 kb) contém genes adicionais integrados em plasmídeos (pUB110) e um transposon (Tn554). O plasmídeo pUB110 carrega um gene responsável por resistência à kanamicina, tobramicina e bleomicina (Ito et al. 2001; Ito et al. 2004; Oliveira et al. 2006). Adicionalmente, isolados de *S. aureus* podem também carrear genes de resistência fora destas ilhas genômicas móveis, inseridos em outras partes do cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (Deurenberg et al. 2007).

Até recentemente, imaginava-se que o SCC*mec* III era o maior entre os seis elementos móveis, com quase 70,0kb. Este elemento conteria plasmídeos com determinantes de resistência (pI258 e pT181), e duas cópias do transposon Tn554. O

pI258 codifica resistência às penicilinas e metais pesados (mercúrio), enquanto o pT181 codifica resistência à tetraciclina. O Tn554 carrega o gene *ermA*, responsável pela resistência induzível a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas. Entretanto, verificou-se que o SCC*mec* III original constituía-se na realidade em dois componentes distintos: (i) um elemento contendo o complexo *mecA* e *ccr* (SCC*mec* III verdadeiro), e (ii) um elemento sem o gene *mecA*, porém carregando uma recombinase específica (*ccrC*), denominado SCC*mercury* (Kondo et al. 2007).

Cinco tipos de *ccr* e três classes de *mec* foram reportados em *S. aureus*, e suas combinações são utilizadas para classificar cada SCC*mec* em uma das seis categorias (SCC*mec* I - VI). Os tipos 1 a 4 de *ccr* carregam os genes *ccrA* e *ccrB*, enquanto o tipo 5 carrega o gene da recombinase *ccrC*. A composição genética das classes de *mec* em *S. aureus* encontra-se reportada abaixo. Enquanto a classe A contém o complexo *mec* íntegro, as classes B e C apresentam os genes regulatórios interrompidos pelas sequências de inserção IS1272 e IS431.

Classe A: IS431*mec-mecA-mecR1-mecI*

Classe B: IS431*mec-mecA-ΔmecR1-IS1272*

Classe C: IS431*mec-mecA-ΔmecR1-IS431*

Isolados clínicos classificados como CA-MRSA geralmente carregam SCC*mec* tipos IV ou V, enquanto a maioria dos MRSA relacionados à IRAS carregam os tipos I, II, ou III (Amorim et al. 2002; Perez-Roth et al. 2004; Tenover et al. 2006). O restrito perfil de sensibilidade *in vitro* de amostras MRSA hospitalares é consequência direta da variedade de sequências de inserção, transposons e plasmídeos carregados por estes elementos móveis.

Amostras de MRSA provenientes de infecções comunitárias são freqüentemente sensíveis a vários antimicrobianos não β -lactâmicos. Esta observação é consistente com a ausência de outros genes de resistência, à exceção do *mecA*, no complexo genômico *SCCmec* de representantes dos tipos IV e V. Por outro lado, algumas linhagens de CA-MRSA podem apresentar resistência a alguns compostos não β -lactâmicos, pela presença de determinantes de resistência inseridos fora do *SCCmec* IV ou V. A maioria dos isolados do clone epidêmico comunitário norte-americano USA300 são resistentes à eritromicina pelo mecanismo de efluxo associado à expressão do gene *msrA*, o qual não é parte integrante do *SCCmec* IV. Esta linhagem pode também apresentar, menos freqüentemente, resistência à tetraciclina e clindamicina mediadas, respectivamente, pelos genes *tet(K)* e *ermC* inseridos em plasmídeos não relacionados ao *SCCmec* (Tenover et al. 2006).

Surtos de infecções comunitárias por clones MRSA contendo *SCCmec* IV foram classicamente relatados nos Estados Unidos, isolados principalmente de lesões de pele/subcutâneo dos pacientes infectados. Algumas populações específicas são mais acometidas pelo tipo IV, principalmente pelo contato físico direto com a pele de outros indivíduos, devido a competições esportivas ou a exposição a situações de aglomeração (Nguyen et al. 2005; Shukla et al. 2004; Tenover et al. 2006).

Infecções causadas pelo tipo IV têm sido relatadas mais recentemente em pacientes hospitalizados, associadas a fatores de risco para IRAS e sem relação aparente com aquisição do patógeno na comunidade (Seybold et al. 2006; Trindade et al. 2005). Esta mudança no cenário epidemiológico mundial foi atribuída por alguns autores a propriedades fenotípicas e genotípicas dos isolados em questão. *SCCmec* tipos IV e V são elementos genéticos relativamente menores, e esta característica pode ter contribuído para a transferência horizontal do tipo IV e conseqüente disseminação

entre diversas linhagens genéticas. Estas amostras parecem também se replicar mais rapidamente, e possuem fatores de virulência raros a outros tipos de *SCCmec*, como a exotoxina PVL (Panton-Valentine leucocidina) (Okuma et al. 2002; Robinson and Enright 2004). A PVL é codificada pelos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, e sua presença em *S. aureus* é associada a casos de infecções de pele e pneumonias necrotizantes (Lina et al. 1999; Vandenesch et al. 2003).

O primeiro isolado *SCCmec* tipo V foi identificado na Austrália, em uma amostra MRSA proveniente da comunidade isolada em 1995 (Ito et al. 2004). Este achado foi seguido de relatos de *SCCmec* V ou suas variantes em Taiwan (Boyle-Vavra et al. 2005), Hong Kong (Ho et al. 2007), e Uruguai (Ma et al. 2005). Apesar da maioria das amostras subsequentes isoladas no continente australiano apresentarem maior diversidade genotípica, as infecções de pele e tecidos moles em Taiwan estavam associadas a um clone predominante portando *SCCmec* V variante (V_T), genotipicamente relacionado ao clone USA1000.

A classificação dos clones internacionais de MRSA foi inicialmente baseada em uma combinação de métodos moleculares específicos, como PFGE e análise de plasmídeos (Oliveira et al. 2002). Somente após a recente descrição do *SCCmec* por Katayama e colaboradores foram desenvolvidos protocolos para tipagem dos diferentes tipos de *SCCmec*, incorporando estes resultados em estudos de epidemiologia molecular de MRSA (Ito et al. 2001; Oliveira and de 2002). As linhagens locais e pandêmicas foram então classificadas por técnicas que avaliam a composição dos tipos de *SCCmec*, conforme incluído na Tabela 1.

Todas as amostras do clone pediátrico foram inicialmente classificadas por pesquisadores em Oeiras, Portugal, como pertencentes ao *SCCmec* IV (Oliveira et al. 2002; Sa-Leao et al. 1999). Posteriormente os mesmos pesquisadores identificaram

um novo alotipo de *ccrAB* (*ccrAB4*) presente em uma das primeiras amostras descritas deste clone (HDE288), o que os levou a re-classificar o *SCCmec* desta amostra como tipo VI. Estudo posterior de vigilância molecular investigou a presença do *SCCmec* VI entre representantes do clone pediátrico provenientes de vários países, porém este novo tipo de *ccrAB* pôde ser detectado somente em isolados MRSA de Portugal (Oliveira et al. 2006). As amostras do clone pediátrico, portanto, podem ser classificadas como *SCCmec* IV ou *SCCmec* VI, ao possuírem, respectivamente, *ccrAB2* ou *ccrAB4*.

Estudos sobre a clonalidade de *S. aureus* foram complementados pela técnica denominada sequenciamento multilocus (MLST; "multilocus sequence typing"). O MLST é baseado na análise das sequências de sete genes constitucionais ("housekeeping") de *S. aureus*. Sequências diferentes correspondem a alelos distintos de cada gene e a um tipo de sequência (ST; "sequence type"). Isolados com os sete alelos semelhantes são relacionados ao mesmo complexo clonal (CC), e a maioria dos MRSA circulantes pode ser agrupada em cinco linhagens: CC8, CC5, CC30, CC45, e CC22 (Enright et al. 2002; Enright et al. 2000). Representantes dos clones mundiais foram individualmente classificados quanto ao ST, correspondendo ao ST-239 (CEB), ST-5 (clones pediátrico e Nova Iorque/Japão), e ST-247 (Ibérico). Os resultados de MLST foram inseridos em uma base de dados digital no endereço <http://www.mlst.net>, permitindo comparações entre sequências de *S. aureus* descritas em diferentes partes do mundo.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a distribuição dos tipos de SCCmec de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) de sete centros médicos na Argentina, Brasil e Chile durante dez anos de vigilância;
- Avaliar a correlação entre o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e os tipos de SCCmec;
- Caracterizar as linhagens genotípicas predominantes de MRSA presentes nestes hospitais pela técnica de eletroforese em campo pulsado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

As amostras bacterianas foram selecionadas do Programa SENTRY. Este programa é constituído por uma rede de vigilância epidemiológica internacional, com coleta de bactérias e dados realizada de forma prospectiva. O principal objetivo do programa é determinar tendências no perfil de sensibilidade antimicrobiana dos principais patógenos causadores de infecções comunitárias e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Pfaller et al. 1998; Sader et al. 2002a). O programa teve início em 1997, com uma ampla rede de hospitais sentinela distribuídos em diferentes regiões geográficas. Os principais sítios monitorados por este estudo incluem infecções da corrente sanguínea, infecções comunitárias do trato respiratório, pneumonias em pacientes hospitalizados, infecções de pele e tecidos moles, e infecções do trato urinário.

O centro coordenador do estudo localiza-se no estado de Iowa, Estados Unidos. Cada centro participante envia isolados bacterianos e respectivos dados epidemiológicos. Apenas um isolado por paciente é enviado ao centro coordenador, evitando-se assim duplicidade de amostras. Os critérios para coleta de espécimes clínicos variam de acordo com os diferentes períodos do estudo. No período de 1997 a 2006 os seguintes critérios foram adotados para seleção e envio dos isolados: (i) os vinte primeiros isolados de infecções de corrente sanguínea de cada mês (1997-2006), (ii) 50 *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* de infecções respiratórias comunitárias (1997-2006); (iii) 50 amostras consecutivas de pneumonia em pacientes hospitalizados (1997-2006; à exceção de 2003), (iv) 50

isolados consecutivos de infecções de pele e tecidos moles (1997-2000; 2002, 2004-2005), (v) 50 isolados consecutivos de infecções do trato urinário (1997-2000 e 2003); (vi) 50 isolados de pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) (2001 e 2003); (vii) 80 isolados consecutivos de pacientes pediátricos (2004); (viii) 100 patógenos Gram-positivos recuperados de qualquer sítio de infecção (2005-2006); *Salmonella* e *Shigella* spp. recuperados de pacientes com gastroenterite.

O centro médico uruguaio participou somente em 1997, sendo substituído por um centro em Caracas, Venezuela (1998-2004). Em 1999 o centro no Rio de Janeiro foi substituído pelo centro de Porto Alegre, e em 2001 um centro em Brasília substituiu o centro de Medellín. Esses dois centros brasileiros participam até hoje do estudo. O México esteve presente em todos os anos do estudo, porém com variações na localização dos centros: cidade do México (até 2003), Guadalajara (2004 – presente), e Durango (2005 – presente). Os centros médicos da Argentina (dois em Buenos Aires), Chile (dois em Santiago), São Paulo e Florianópolis participam até hoje do estudo.

A identificação da espécie/gênero foi feita localmente nos centros participantes pelas metodologias utilizadas na rotina microbiológica de cada laboratório. Ao serem recebidos pelo centro coordenador são cultivados em ágar sangue, e, quando necessário, submetidos a testes bioquímicos convencionais ou ao sistema automatizado Vitek (bioMérieux Vitek, Hazelwood, MO, EUA) para confirmação da identificação bacteriana.

Os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a metodologia estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and Laboratories Standard Institute 2006). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração

capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. Os agentes antimicrobianos foram obtidos dos respectivos fabricantes, e o controle de qualidade incluiu as seguintes cepas ATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. A interpretação dos testes foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007). Os antimicrobianos testados rotineiramente para *S. aureus* foram: oxacilina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol (até 2005), eritromicina, gentamicina, linezolida, rifampicina (até 2005), tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, vancomicina, e teicoplanina.

Para o presente estudo utilizaram-se amostras de *S. aureus* de sete centros participantes do Programa SENTRY na América Latina, distribuídos na Argentina, (dois centros em Buenos Aires); Brasil (São Paulo, Florianópolis e Porto Alegre) e Chile (dois centros em Santiago) (Figura 1). À exceção do centro de Porto Alegre, que ingressou no estudo em 1999, todos os demais seis centros médicos participaram do Programa SENTRY durante os 10 anos avaliados, e foram incluídos no presente estudo por este motivo.



Figura 1. Localização geográfica dos sete centros médicos na América do Sul participantes do presente estudo. Programa SENTRY na América Latina, 1997-2006.

3.2. Seleção das amostras para o estudo

3.2.1. Identificação dos isolados MRSA e seleção dos perfis de resistência

Inicialmente, foram identificadas retrospectivamente, do banco de dados do Programa SENTRY, todas as amostras clínicas de MRSA dos sete centros médicos latino-americanos, isoladas entre 1997-2006. Partiu-se então para avaliação da sensibilidade das mesmas a antimicrobianos não β -lactâmicos, com o objetivo de separar perfis das cepas mais sensíveis e mais resistentes. Dois grupos distintos foram criados, baseados nos resultados de microdiluição em caldo a oito agentes não β -lactâmicos:

- **Grupo 1:** inclui amostras de MRSA resistentes à eritromicina e a não mais de três dos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol. Este grupo foi selecionado visando diferenciar as mesmas do padrão multirresistente do CEB. Essas amostras de MRSA foram denominadas multissensíveis (MS-MRSA).
- **Grupo 2:** inclui amostras de MRSA resistentes a seis ou mais dos seguintes agentes: ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol. Essas amostras de MRSA foram denominadas multirresistentes (MR-MRSA).

Isolados de MRSA que não se enquadravam em nenhum dos dois perfis acima foram excluídos da análise.

3.2.2. Avaliação das características genotípicas das amostras MS-MRSA e MR-MRSA

Para avaliar o perfil molecular das amostras MS-MRSA e MR-MRSA, selecionou-se um grupo representativo de cada perfil de sensibilidade, distribuído por país e ano de isolamento.

- **Grupo 1:** Foi selecionado, sempre que possível, um isolado de MS-MRSA por ano de cada um dos sete centros médicos, perfazendo um total de 67 amostras.
- **Grupo 2:** Foram incluídos 5 isolados por ano de cada um dos 3 centros brasileiros (50 isolados de São Paulo, 50 de Florianópolis e 40

de Porto Alegre) e um isolado por ano de cada um dos centros localizados na Argentina e Chile (40 isolados), perfazendo assim 180 amostras. Para caracterização das amostras de MRSA multirresistentes em nosso país, procedeu-se à seleção de um maior número de isolados no Brasil.

Os seguintes dados demográficos foram também analisados, para cada grupo de isolados: sexo e idade dos pacientes, e sítio de infecção do qual foram coletadas as amostras.

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados na Universidade de Iowa e no JMI (Jones Microbiology Institute) Laboratories, Iowa, Estados Unidos. Os demais testes foram realizados nos laboratórios ALERTA e LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica), ambos vinculados à Disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene *nuc*

Todas as cepas de MRSA selecionadas para o presente estudo foram submetidas à confirmação da identificação da espécie, utilizando a detecção do gene *nuc* pela técnica de PCR. Os *primers* foram desenhados localmente, partir de seqüências de DNA genômico incluídas no banco de dados GenBank, da cepa MRSA 252 (número de acesso GenBank NC_002952).

5` GCCACGTCCATATTTATCAG 3`*nuc* - R1

5` TATGGTCCTGAAGCAAGTG 3`*nuc* - F1

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (Zhang et al. 2005). Após crescimento bacteriano em

placa de ágar Columbia contendo sangue de carneiro a 5%, uma a cinco colônias bacterianas foram suspensas em 50 µL de água destilada estéril e aquecidas a 99°C durante 10 minutos. Depois da centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos, foram utilizados 0,5µL do sobrenadante para a reação de PCR de volume final de 10 µL.

Para a reação de amplificação foi utilizada 5µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), um total de 1µL de primers, 3,5 µL de água estéril deionizada e 0,5µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese. Como controle positivo foi utilizado a cepa NCTC 10442, e como controle negativo água destilada deionizada estéril.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 25 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

3.4. PCR multiplex para determinação do tipo de SCCmec

3.4.1. Método de PCR mutiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Zhang e colaboradores

A determinação do tipo de SCCmec e do gene *mecA* foi realizada utilizando-se o método de PCR mutiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Zhang

e colaboradores (Zhang et al. 2005). Este protocolo permite detectar os tipos I a V de *SCCmec*, além de quatro subtipos de *SCCmec* IV (IVa, IVb, IVc, e IVd).

São utilizados 9 *loci*, selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente, disponível no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index>) (Ito et al. 2001; Ito et al. 1999). Os respectivos alvos, cepas e números de acesso do GenBank no qual este protocolo foi delineado são descritos a seguir e na tabela 2:

- *SCCmec* tipo I: ORF E008 da cepa NCTC (National Collection of Type Cultures) 10442 (número de acesso GenBank AB033763)
- *SCCmec* tipo II: *kdpE* da cepa N315 (número de acesso GenBank D86934)
- *SCCmec* tipo III: ORF CZ049 da cepa 85/2082 (número de acesso GenBank AB37671)
- *SCCmec* tipo IVa: ORF CQ002 da cepa CA05 (número de acesso GenBank AB063172)
- *SCCmec* tipo IVb: ORF CM001 da cepa 8/6-3P (número de acesso GenBank AB063173)
- *SCCmec* tipo IVc: ORF CR002 da cepa MR108 (número de acesso GenBank AB096217)
- *SCCmec* tipo IVd: ORF CG001 da cepa JCSC4469 (número de acesso GenBank AB0967677)
- *SCCmec* tipo V: ORF V011 da cepa JCSC3624 (número de acesso GenBank AB12121)

- *mecA*: gene *mecA* da cepa NCTC8325 (número de acesso GenBank X52593)

Tabela 2. Seqüência dos *primers* utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*

<i>Primer</i>	Seqüência de oligonucleotídeos (5´- 3´)	Tamanho amplicon (pb)	Especificidade
Tipo I-F	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
Tipo II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
Tipo III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG		
Tipo IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		
Tipo IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
Tipo IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
Tipo IVd-F	CTCAAATACGGACCCCAATACA	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo IVd-R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
Tipo V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325	SCC <i>mec</i> V
Tipo V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
MecA147-F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147	<i>mec</i> A
MecA147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT		

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura. Após crescimento bacteriano em placa de ágar Columbia contendo sangue de carneiro a 5%, uma a cinco colônias bacterianas foram suspensas em 50 µL de água destilada estéril e aquecidas a 99°C durante 10 minutos. Depois da centrifugação a 13000 rpm

durante 3 minutos, foram utilizados 2 μ L do sobrenadante para a reação de PCR de volume final de 25 μ L.

Para a reação de amplificação foi utilizada a seguinte mistura de reação: 12,5 μ L de Master Mix para multiplex (Qiagen, Valencia, CA, EUA), um total de 7,7 μ L de primers, 2,8 μ L de água estéril deionizada e 2 μ L do sobrenadante da suspensão bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguido por 10 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 65°C e 1,5 min a 72°C e outros 25 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C e 1,5 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 40 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp. O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Como controles positivos para os diferentes tipos de SCC*mec* foram utilizadas as seguintes cepas de MRSA: NCTC 10422 (SCC*mec* tipo I), N315 (SCC*mec* tipo II), 85/2082 (SCC*mec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (SCC*mec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (SCC*mec* tipo IVb), MR 108 (SCC*mec* tipo IVc), JCSC 4469 (SCC*mec* tipo IVd) e JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (SCC*mec* tipo V) (Ito et al. 2001;Ito et al. 2004;Ma et al. 2002;Okuma et al. 2002). Todos os controles foram gentilmente cedidos pelo Prof Keiichi Hiramatsu e Prof^a Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão, e Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago,

Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois. Como controle negativo foi utilizado água destilada deionizada estéril.

3.4.2. *Método de PCR multiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Milheiriço e de Lencastre*

As amostras de MRSA consideradas não tipáveis pelo protocolo de Zhang e colaboradores foram submetidas ao protocolo recentemente publicado por Milheiriço e de Lencastre (Milheirico et al. 2007). Este protocolo baseia-se em uma reação multiplex para identificar os tipos de SCCmec I a VI, e é uma atualização do protocolo publicado em 2002 por Oliveira e de Lencastre, o qual identificava somente os tipos I-IV (Oliveira and de 2002).

Foram utilizados 10 *loci* (Tabela 3), selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente (Ito et al. 2001; Ito et al. 1999; Oliveira and de 2002). O *locus* A encontra-se na região J1, "downstream" ao gene *pls*, sendo específico para o SCCmec tipo I; o *locus* B e é um fragmento interno do operon *kdp*, que é específico para o SCCmec tipo II; o *locus* C é um fragmento interno do gene *mecl* presente nos SCCmec tipos II e III; o *locus* D é um fragmento interno da região *dcs*, presente nos SCCmec tipos I, II, IV e VI. O *locus* F é específico para o SCCmec tipo III, e está localizado na região J3, entre o Tn554 e a junção da região direita aberta para leitura *orfX* ("open reading frame"). Além destes *loci*, que já faziam parte do protocolo anterior, foram acrescentados primers para detecção do *ccrB2* (específico para tipos II e IV), *ccrC* e região J1 do tipo V (específicos para tipo V), e região J1 do SCCmec III. Os *loci* E, G e H do protocolo anterior foram excluídos.

Tabela 3. Seqüência dos *primers* utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*

locus	Primer	Sequencia de oligonucleotídeos (5´- 3´)	Tamanho amplicon (pb)	Especificidade
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	SCC <i>mec</i> tipo I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	SCC <i>mec</i> tipo II
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
C	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC	209	SCC <i>mec</i> tipos II e III
	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	SCC <i>mec</i> tipos I, II e IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	SCC <i>mec</i> tipo III
	RIF5 R13	GTCACAGTAATTCCATCAATGC		
	<i>ccrC</i> F2	GTACTCGTTACAATGTTTGG	449	SCC <i>mec</i> tipo V
	<i>ccrC</i> R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		
	SCC <i>mec</i> V J1 F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	377	SCC <i>mec</i> tipo V
	SCC <i>mec</i> V J1 F	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
	<i>ccrB2</i> F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	311	SCC <i>mec</i> tipos II e IV
	<i>ccrB2</i> R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
	SCC <i>mec</i> III J1 F	CATTTGTGAAACACAGTACG	243	SCC <i>mec</i> tipo III, J1
	SCC <i>mec</i> III J1 R	GTTATTGAGACTCCTAAAGC		
<i>mecA</i>	MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162	<i>mecA</i>
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo segundo Soolingen e colaboradores (van Soolingen D. et al. 1991). Para a reação de amplificação foi utilizada a seguinte mistura de reação: 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 200nM dos primers kdp F1, kdp R1, 400nM dos *primers* CIF2 F2, CIF2 R2, SCC*mec* III J1F, SCC*mec* III J1R, SCC*mec* V J1 F,

SCC*mec* V J1 F, RIF5 F10, RIF5 F13, 800nM dos *primers* mecl P2, mecl P3, DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7, ccrB2 F2, ccrB2 R2, ccrC F2, ccrC R2 e 5ng de DNA. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 4 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 4 min a 72°C. Os tubos foram então mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 0,5X por 1h a 110V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O DNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio 0,5 µg/mL e posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Como controles positivos para os diferentes tipos de SCC*mec* foram utilizadas as seguintes cepas de MRSA: NCTC 10422 (SCC*mec* tipo I), N315 (SCC*mec* tipo II), 85/2082 (SCC*mec* tipo III), JSC / CA05 1968 (SCC*mec* tipo IV), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (SCC*mec* tipo V), e HDE 288 (SCC*mec* tipo VI). Todos os controles foram gentilmente cedidos por: Prof Keiichi Hiramatsu e Prof^a Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão; Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois, e Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal. Como controle negativo foi utilizado água destilada deionizada estéril.

3.5. Detecção do complexo gene *ccr*

As amostras positivas pela reação de multiplex para SCC*mec* tipo IV ou VI foram submetidas à detecção do complexo *ccr* pela técnica de PCR. Utilizou-se primers que diferenciam amostras SCC*mec* tipo IV (*ccrAB2*) de amostras contendo SCC*mec* tipo VI (*ccrAB4*). Os primers foram sintetizados segundo Kondo e colaboradores (Kondo et al. 2007), desenhados a partir de sequências de DNA genômico incluídas no banco de dados GenBank.

ccrA2: 5' – TAAAGGCATCAATGCACAAACACT – 3'

ccrB2: 5' – ATTGCCTTGATAATAGCCITCT – 3'

ccrA4: 5' – GTATCAATGCACCAGAACTT – 3'

ccrB4: 5' – TTGCGACTCTCTTGGCGTTT – 3'

Para a extração do DNA genômico foi utilizada a extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (Zhang et al. 2005). Após crescimento bacteriano em placa de ágar Columbia contendo sangue de carneiro a 5%, uma a cinco colônias bacterianas foram suspensas em 50 µL de água destilada estéril e aquecidas a 99°C durante 10 minutos. Depois da centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos, foram utilizados 0,5 µL do sobrenadante para a reação de PCR de volume final de 10 µL.

Para a reação de amplificação foi utilizada 5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), um total de 1µL de primers, 3,5 µL de água estéril deionizada e 0,5µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 2 min a 94°C, 1 min a 57°C e 2 min a 72°C. O programa termina com uma

extensão adicional de 2 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 25 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Como controles positivos para os diferentes tipos de ccr foram utilizadas as seguintes cepas de ORSA: JCSC 1968 (para *ccrAB2*) e HDE288 (para *ccrAB4*). Como controle negativo foi utilizado água destilada deionizada estéril.

3.6. Etest®

Além da determinação da CIM para oxacilina pela técnica de microdiluição em caldo no centro coordenador, todas as amostras SCC*mec* IV foram testadas no LEMC pela técnica de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia). As amostras foram retiradas da coleção de microrganismos do LEMC e cultivadas em ágar-sangue (Columbia Blood Agar, DIFCO, enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o crescimento inicial os isolados foram subcultivados e o inóculo preparado em caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para obtenção de uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml e então inoculados em ágar Mueller-Hinton (Clinical and Laboratories Standard Institute 2006). Sobre as placas já inoculadas foram depositadas tiras de Etest® contendo diferentes concentrações de oxacilina. As placas foram incubadas em estufa à 35°C em aerobiose. A leitura da CIM foi realizada segundo instruções do fabricante. O controle

de qualidade foi realizado com a cepa ATCC de *S. aureus* 29213. Os resultados foram interpretados segundo o documento do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007).

3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene *lukF*, codificador da PVL (Panton Valentine Leukocidin)

Todas as amostras de MRSA apresentando SCC_{mec} IV pelos protocolos de Zhang ou Milheiriço foram submetidas a testes para detecção do gene que codifica PVL. Os primers foram sintetizados segundo Figueiredo e colaboradores (Ribeiro et al. 2005a), a partir de seqüências de DNA genômico incluídas no banco de dados GenBank (número de acesso GenBank AB006796).

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (Zhang et al. 2005). Após crescimento bacteriano em placa de ágar Columbia contendo sangue de carneiro a 5%, uma a cinco colônias bacterianas foram suspensas em 50 µL de água destilada estéril e aquecidas a 99°C durante 10 minutos. Depois da centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos, foram utilizados 0,5µL do sobrenadante para a reação de PCR de volume final de 10 µL.

Para a reação de amplificação foi utilizada 5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), um total de 1µL de primers, 3,5 µL de água estéril deionizada e 0,5µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento

da eletroforese. Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 25 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Como controle positivo foi utilizada a cepa de MRSA MR 108 (SCC*mec* tipo IVc, portadora do gene *lukF*), e como controles negativos a cepa N315 (SCC*mec* tipo II) e água destilada deionizada estéril.

3.8. Análise do polimorfismo do DNA cromossômico

A análise do DNA cromossômico dos isolados de MRSA foi realizada pela técnica de eletroforese em gel em campo pulsado ("pulsed-field gel electrophoresis" - PFGE), após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *Sma*I. Esta técnica é uma variação da eletroforese convencional, onde a corrente elétrica varia alternadamente de direção e o uso de enzimas de restrição com sítios de reconhecimento longos permite a digestão do cromossomo em fragmentos maiores. Esta técnica foi realizada segundo recente protocolo estabelecido nos Estados Unidos pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia), para tipagem molecular de *S. aureus* (McDougal et al. 2003).

Uma colônia do isolado teste foi inoculada em 5 ml de caldo BHI (brain heart infusion) e incubada a 35-37°C por 24 horas, com agitação vigorosa. As concentrações das suspensões celulares foram ajustadas com solução salina até atingir uma leitura de turbidez de 1,1 a 1,3. Uma alíquota de 200 µl da suspensão de células ajustadas foi transferida para um tubo de microcentrífuga de peso conhecido,

centrifugado a 12.000 X g por aproximadamente 2 a 4 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. Os tubos foram novamente pesados com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células). O centrifugado foi resuspenso em 300 μ L da solução tampão Tris-EDTA (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM) e incubado a 37°C por 10 minutos. À esta suspensão celular foram adicionados 4 μ L de solução convencional (L 7386/Sigma, St. Louis, Mo, EUA), ou 3 μ L de solução recombinante (L 0761/Sigma) de lisostafina (1 mg/ml 20mM de acetato de sódio, pH 4,5), e 300 μ L de gel de agarose 1,8% SeaKem Gold (FMC, Rockland, Maine, EUA) em solução tampão Tris-EDTA à 55°C. Estes pequenos blocos de gel, contendo DNA cromossômico, foram incubados por um período mínimo de quatro horas em solução EC (Tris 6 mM, ph 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; Brij-58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato de sódio 0,2% e 0,5% de sódio lauroylsarcosina) à 37°C. A seguir, os blocos de gel foram lavados várias vezes em solução tampão Tris-EDTA e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Os plugs foram cortados em três partes iguais e armazenados em tampão de restrição 1x por 30 minutos. O tampão de restrição das amostras foi removido e o DNA das amostras de *S. aureus* foi digerido com 3 μ l da enzima *Sma*I (Promega R6125, 10U/ μ l) em 200 μ l do tampão de restrição 1x, com incubação a 25°C por duas a três horas. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os fragmentos de restrição resultantes foram colocados no aparelho de eletroforese com corrente alternando de 5 a 40 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14°C durante 21 horas em gel de agarose a 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio (1,5 μ g/mL) por vinte minutos, descorados em água bidestilada por mais 45 minutos, e fotografados sob luz ultravioleta com filme FUJI FTI-500 e capturados com o programa LISCAP Image

Capture Software com o aparelho ImageMaster[®] (Amersham Pharmacia Biotech AB, CA, EUA). As fotos foram digitalizadas e salvas como arquivo TIF para análise posterior.

Como padrão de peso molecular, foi utilizado o Lambda DNA ladder (New England Biolabs, EUA) na primeira e última coluna de cada gel. Além do peso molecular, foi incluída a cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325, posicionada a cada cinco ou seis amostras clínicas, em todos os géis de PFGE. A amostra NCTC 8325 foi gentilmente cedida pela Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal (número de acesso GenBank CP000253).

Amostras de MRSA representantes de clones mundiais ou locais foram também incluídas nos experimentos: NCTC 10422 (*SCCmec* tipo I), N315 (*SCCmec* tipo II), 85/2082 (*SCCmec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (*SCCmec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (*SCCmec* tipo IVb), MR 108 (*SCCmec* tipo IVc), JCSC 4469 (*SCCmec* tipo IVd), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (*SCCmec* tipo V), A1721/HU25 (Clone Brasileiro Epidêmico, *SCCmec* tipo III), WB72 (USA 300, *SCCmec* tipo IV), MW2 (USA 400, *SCCmec* tipo IV), WB49 (Oceania South Pacific Clone, *SCCmec* IV), HAR24 (EMRSA - 15, *SCCmec* tipo IV), HAR24 (EMRSA - 16, *SCCmec* tipo II), BK2464 (New York - Japan, *SCCmec* II), HDE288 (Clone Pediátrico / USA800, *SCCmec* IVa). Todos os controles foram gentilmente cedidos pelo Prof Keiichi Hiramatsu e Prof^a Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão; Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois; Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portuga; Prof. Agnes Figueiredo, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A tabela 4 sumariza todas as cepas controle utilizadas no presente estudo.

Tabela 4. Cepas de *S. aureus* utilizadas como controles no presente estudo.

Nome da Amostra	Clone	SCCmec
ATC8325	-	-
ATC10442	-	SCCmec tipo I
N315	-	SCCmec tipo II
FC85/2082	-	SCCmec tipo III
ASC1968	-	SCCmec tipo IVa
ASC1978	-	SCCmec tipo IVb
MR108	-	SCCmec tipo IVc
ASC4469	-	SCCmec tipo IVd
WIS	WBG8318	SCCmec tipo V
A1721	Clone Epidêmico Brasileiro	SCCmec tipo III
WB72	USA 300	SCCmec tipo IV
MW2	USA 400	SCCmec tipo IV
WB49	Oceania South Pacific Clone	SCCmec tipo IV
HAR22	EMRSA - 15	SCCmec tipo IV
HAR24	EMRSA - 16	SCCmec tipo II
3K2464	New York - Japan - USA 100	SCCmec tipo II
HU25	Clone Epidêmico Brasileiro	SCCmec tipo III
IDE 288	Clone Pediátrico - USA800	SCCmec tipo VI

Os géis foram incluídos e processados pelo programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) como imagens preto e branco invertidas de 8 bits. Para cada imagem, é realizada análise espectral para determinar o tamanho

do disco a ser utilizado na extração do plano de fundo da imagem, pela técnica de rolamento de disco.

As cepas de referência *S. aureus* NCTC 8325 de cada gel foram normalizadas entre si e com a cepa de referência universal NCTC 8325. Após digestão com a enzima *Sma*I, esta cepa produz 13 bandas visivelmente definidas, distribuídas entre 674 kb e 36 kb. A cepa NCTC 8325 é considerada padrão internacional de referência para normalização dos fragmentos cromossômicos de amostras de *S. aureus* submetidas à PFGE. O processo de normalização é etapa essencial e obrigatória para corrigir as distorções intra e inter géis que podem ocorrer na técnica de PFGE. Bandas de amostras clínicas situadas acima da maior banda da NCTC (674 kb) não são incluídas para análise, pois estas bandas não serão normalizadas. Da mesma maneira, bandas abaixo de 36 kb são excluídas da análise pela menor resolução destas bandas de baixo peso molecular e impossibilidade de normalização das mesmas (Murchan et al. 2003).

Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida individualmente, por comparação visual. O coeficiente de similaridade utilizado foi o coeficiente de Dice (Dice 1945), baseado na presença e posição de bandas. O dendograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages) (Sneath and Sokal 1973). Este algoritmo realiza as análises através de agrupamentos por médias não ponderadas. Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,8 e 1,8%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados (McDougal et al. 2003; Suelens et al. 1992).

3.9. Análise de dados

Processamento e análise de dados foram realizados pelos pacotes estatísticos EpiInfo, versão 6,04 (Centers for Disease Control, 2001) e SPSS (versão 15,0; SPSS Inc., Chicago, Illinois). As características demográficas (sexo, idade) e sítio de infecção foram analisados por grupo.

Teste qui-quadrado ou teste de Fisher, quando apropriado, foram utilizados para avaliar diferenças entre proporções. Gráficos-caixa ("Box-plots") foram construídos para visualizar a dispersão de variáveis contínuas, excluindo os valores extremos da distribuição. A caixa representa o intervalo interquartil que contém 50% dos valores.

A média geométrica das CIMs de oxacilina obtidos por Etest[®], assim como os respectivos intervalos de 95% de confiança (IC 95%), foram calculados para todas as amostras que possuíam SCCmec tipo IV. Para efeito de análise de dados, as amostras com valores de CIM acima de 256 µg/ml (última diluição da fita de Etest[®]) foram consideradas como CIM = 512 µg/ml.

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram calculados para cada perfil fenotípico, assumindo-se como padrão ouro os resultados de SCCmec. A sensibilidade do grupo MS-MRSA foi calculada como o percentual de fenótipo MS-MRSA no total de SCCmec I, IV, V e VI, quando pertinente. Em analogia, a sensibilidade do grupo MR-MRSA foi calculada em relação ao SCCmec tipos II e III. A especificidade do grupo MS-MRSA foi calculada como o percentual do mesmo em relação ao total de SCCmec II e III; a especificidade do grupo MR-MRSA foi calculada em relação ao total do mesmo entre os tipos I, IV, V e VI. O valor preditivo positivo (VPP) do MS-MRSA foi calculado como a proporção do

SCC*mec* tipo IV e VI no total de MS-MRSA. O valor preditivo negativo (VPN) do grupo MR-MRSA foi calculado como a proporção de SCC*mec* tipos I, II e III em relação ao total de MR-MRSA.

Valores de p menores de 5% (bicaudal) foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Distribuição das amostras MS-MRSA e MR-MRSA

Dos sete centros participantes do estudo, identificou-se 6.739 amostras de *S. aureus* no banco de dados do Programa SENTRY, das quais 39,0% (2.629) apresentavam resistência à oxacilina (MRSA). Os perfis MS-MRSA e MR-MRSA foram identificados, respectivamente, em 24,5% e 45,3% dos isolados resistentes à oxacilina.

No total, 197 amostras de MRSA foram encaminhadas para testes adicionais, sendo 56 amostras MS-MRSA e 141 amostras MR-MRSA.

- **Grupo 1:** um total de 56 amostras MS-MRSA, entre as 67 pretendidas inicialmente, foram analisadas neste grupo. Onze amostras não puderam ser analisadas, pois foram consideradas fenotipicamente MRSA, porém não possuíam o gene *mecA*, ou devido a não viabilidade das mesmas decorrente do processo de armazenamento e envio dos isolados. Os centros de Florianópolis e Porto Alegre registraram as maiores perdas, e, portanto, alguns destes MRSA foram substituídos por amostras MS-MRSA isoladas em São Paulo.
- **Grupo 2:** um total de 141 amostras MR-MRSA, entre as 180 selecionadas, foram analisadas neste grupo. Trinta e nove amostras não puderem ser analisadas, pois foram consideradas fenotipicamente MRSA, porém não possuíam o gene *mecA*, ou devido a não viabilidade das mesmas decorrente do processo de armazenamento e envio dos isolados. Em relação às perdas, não houve diferença significativa entre os centros médicos selecionados.

As 197 amostras clínicas selecionadas para análise por métodos moleculares estão representadas na tabela 5, de acordo com o país de origem. Um total de 66,4% das amostras pertencia a centros médicos brasileiros.

Tabela 5. Distribuição dos isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à oxacilina selecionados para testes moleculares dos perfis MS-MRSA e MR-MRSA

Perfil	País / Número de amostras (%)			Total
	Argentina	Brasil	Chile	
MS-MRSA	16 (47,0)	24 (18,3)	16 (50,0)	56 (28,4)
MR-MRSA	18 (52,9)	107 (81,7)	16 (50,0)	141 (71,6)
Total	34	131	32	197 (100)

4.2. Resultados da caracterização genética das amostras

4.2.1 Perfil MS-MRSA

Todas as 56 amostras de MRSA deste perfil submetidas a testes adicionais apresentaram amplificação positiva para o gene *nuc*, e continham o gene *mecA*. Os resultados do multiplex para determinação do SCC*mec* pela metodologia de Zhang e colaboradores mostraram que a maioria das amostras amplificou para SCC*mec* I (35,7%) ou IV (35,7%). Dentre as 20 amostras tipo IV, 19 pertenciam ao subtipo IVa e uma ao subtipo IVc. Apenas duas amplificaram para SCC*mec* III, e nenhuma amostra pertencente aos tipos II ou V de SCC*mec* foi identificada.

Um total de 12 amostras pelo protocolo de Zhang não produziu nenhuma banda visível, e duas amostras amplificaram para os tipos I, IVb e IVc. O

protocolo de Milheiriço e colaboradores conseguiu definir o tipo de SCCmec em 12 destas amostras não tipáveis, totalizando 26 amostras SCCmec IV neste perfil. Cinco amostras tidas como não tipáveis pelo protocolo de Zhang apresentaram amplificação somente para os primers da região *dcs*, o que representaria amostras do tipo VI segundo a interpretação do protocolo de Milheiriço. A relação entre os resultados dos dois protocolos está descrita na tabela 8.

Nenhuma amostra SCCmec tipo IV pelo protocolo multiplex de Zhang foi positiva para *ccrAB4*, excluindo a possibilidade de pertencerem ao tipo VI. Três amostras SCCmec IV não apresentaram amplificação para *ccrAB2*. Duas das cinco amostras positivas pelo protocolo de Milheiriço somente para a região *dcs* (SCCmec VI) apresentaram amplificação para *ccrAB4*, ambas isoladas no Chile, nos anos de 2002 e 2005.

Entre as amostras SCCmec tipo IV, cinco apresentaram amplificação para o gene que codifica PVL. Três foram isoladas em Buenos Aires, e duas em São Paulo e Florianópolis, provenientes do trato respiratório e infecção de pele/subcutâneo.

As 26 amostras SCCmec IV foram submetidas à determinação da CIM de oxacilina. Os valores de CIM variaram de 8 a > 256 µg/ml. A média geométrica obtida foi de 45,1 µg/ml (IC95% = 28,9 - 70,4 µg/ml).

4.2.2. Perfil MR-MRSA

Todas as amostras deste grupo também apresentaram amplificação positiva para o gene *nuc*, e continham o gene *mecA*. 78,0% das mesmas amplificaram para SCCmec III, de acordo com Zhang e colaboradores. Três amostras amplificaram para tipo I, 18 não produziram nenhuma banda visível, e dez amostras amplificaram

concomitantemente para os tipos I e III. O protocolo de Milheiriço conseguiu identificar mais 24 amostras tipo III e duas tipo VI entre as não tipáveis por Zhang (Tabela 6). Estas duas amostras tidas como tipo VI não amplificaram para *ccrAB4*.

Tabela 6. Resultados de SCCmec segundo protocolo de Milheiriço e colaboradores, para as amostras não tipáveis pelo protocolo de Zhang e colaboradores.

	SCCmec - Protocolo Milheiriço				Total
	III	IV	NT ^a	VI	
SCCmec -Protocolo Zhang					
I/III	9	0	1	0	10
I/IVb/IVc	0	0	2	0	2
ausência de bandas	16	6	1	7	30
Total	25	6	4	7	42

a. NT: amostras com resultado não tipável

4.2.3. Distribuição de SCCmec entre os países

A tabela 7 mostra a distribuição final dos tipos de SCCmec entre os dois perfis, estratificada por país de origem. A maioria das amostras identificadas como SCCmec VI estava concentrada na Argentina. Todos os países apresentaram amostras SCCmec I, III e IV, porém distribuídas em proporções distintas entre estas regiões geográficas. Um total de 82,5% das amostras avaliadas no Brasil foram SCCmec tipo III, enquanto a maioria (53,1%) dos isolados do Chile carregavam SCCmec tipo I.

Na Argentina, a maioria das 18 amostras classificadas como MR-MRSA (94,4%) amplificou para SCCmec tipo III. Por outro lado, entre os 16 isolados avaliados MS-MRSA, não houve total predominância de um tipo específico de SCCmec, havendo representantes dos tipos I, IV e VI.

No Brasil, a maioria das 24 amostras multissensíveis estava associada a SCCmec tipo IV (83,3%). À exceção de dois isolados em Porto Alegre e Florianópolis, a maioria das amostras tipo IV no Brasil foi detectada em São Paulo. A única amostra SCCmec tipo I foi isolada em Florianópolis. Entre as 131 amostras avaliadas nos 3 centros médicos brasileiros, menos de 2% foram consideradas não tipáveis.

Tabela 7. Distribuição dos tipos de SCCmec, estratificados por país e perfil de sensibilidade

País / Perfil	Número de amostras (%)				
	SCCmec				
	I	III	IV	NT	VI
Argentina					
MS-MRSA	5 (31,3)	0 (0,0)	5 (31,3)	2 (12,5)	4 (25,0)
MR-MRSA	0 (0,0)	17 (94,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,5)
Brasil					
MS-MRSA	1 (4,1)	3 (12,5)	20 (83,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
MR-MRSA	0 (0,0)	105 (98,1)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)
Chile					
MS-MRSA	14 (87,5)	0 (0,0)	1 (6,2)	0 (0,0)	1 (6,2)
MR-MRSA	3 (18,8)	12 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (6,2)
Total (n=197)	23 (11,7)	137 (69,5)	26 (13,2)	4 (2,0)	7 (3,6)

Entre as 137 amostras contendo SCCmec III, 17,5% apresentaram resistência aos oito compostos não β -lactâmicos. Os fenótipos de co-resistência mais comuns compreenderam amostras sensíveis ou intermediárias à rifampicina (32,1%), ou à cloranfenicol e rifampicina (27,7%), e resistentes aos demais antimicrobianos.

À exceção de eritromicina, a maioria dos isolados contendo SCCmec IV (80,7%) foram sensíveis a todos os agentes não β -lactâmicos testados. Quatorze dos 21 MRSA SCCmec I expressavam resistência *in vitro* à eritromicina, ciprofloxacina, clindamicina e gentamicina, e quatro isolados expressavam somente aos três primeiros compostos.

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram calculados para os perfis MS-MRSA e MR-MRSA em relação aos resultados obtidos para SCCmec (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os perfis MS-MRSA e MR-MRSA em comparação aos resultados de SCCmec.

Perfil / SCCmec		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	VPP ^a (IC 95%)	VPN ^b (IC 95%)
Argentina, Brasil e Chile	MR-MRSA / SCCmec III	97,8 (93,2-99,4)	91,1 (79,6,3-96,7)	96,4 (91,4-98,7)	94,4 (83,7-98,6)
Brasil	MS-MRSA / SCCmec IV	100 (80,0-100)	96,3 (90,3-98,8)	83,3 (61,8-94,5)	100 (95,6-100)
Chile	MS-MRSA / SCCmec I	82,4 (55,8-95,3)	86,7 (58,4-97,7)	87,5 (60,4-97,8)	81,3 (53,7-95,0)

a. Valor preditivo positivo; b. Valor preditivo negativo

4.2.4. Distribuição de SCCmec de acordo com dados demográficos

Em relação aos dados demográficos, verificou-se que a maioria dos pacientes era do sexo masculino (57,9%). Ao se realizar a estratificação por subgrupos

de SCCmec, a predominância do sexo masculino continuou entre os tipos I, II, III, e VI, mas não entre os isolados do tipo IV, no qual 56,5% dos pacientes eram mulheres. Esta diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa.

A mediana de idade dos pacientes variou conforme o tipo de SCCmec. Entre os três tipos principais de SCCmec, o maior valor foi relacionado aos tipos III (52 anos) e I (51 anos). Os pacientes acometidos por isolados MRSA do tipo IV apresentaram o menor resultado de mediana de idade (36 anos), sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo de pacientes com MRSA SCCmec I e III ($p = 0,03$) (Figura 2).

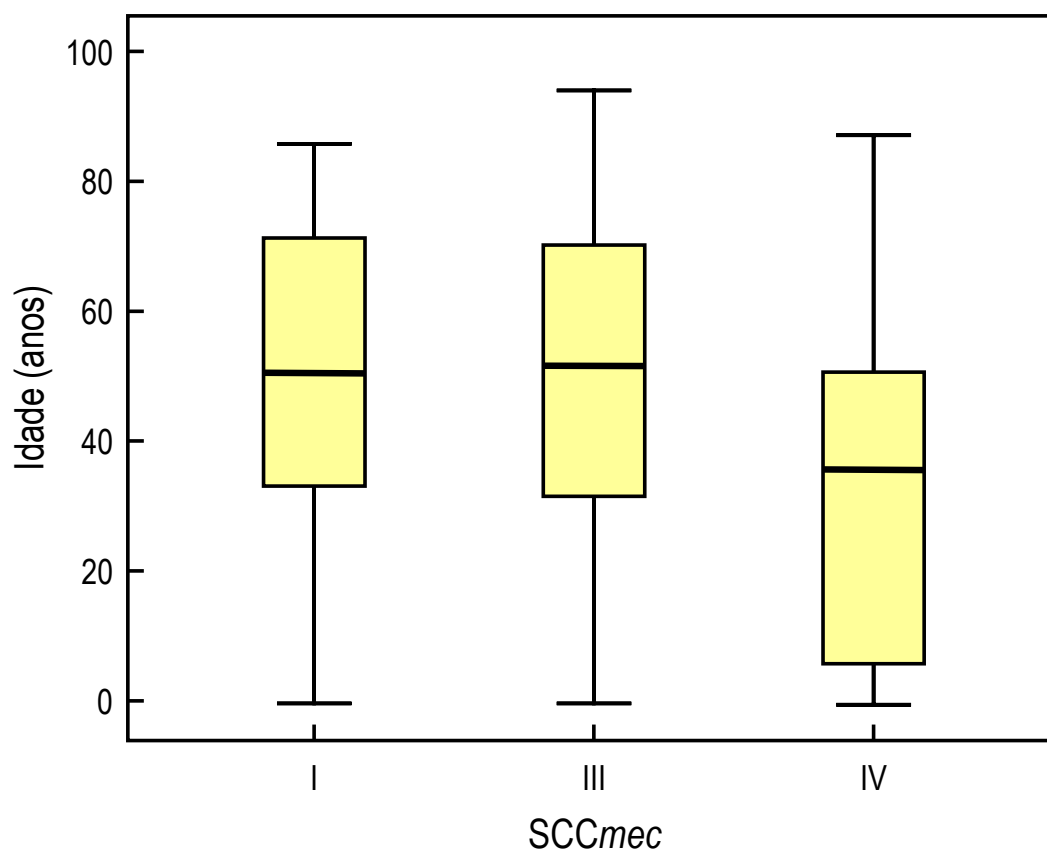


Figura 2. Gráfico-caixa da distribuição da idade dos pacientes (eixo Y) nos diferentes tipos de SCCmec (eixo X). A caixa representa o intervalo interquartil que contém 50% dos valores (do percentil 75 ao 25). A linha horizontal dentro da caixa representa a mediana (percentil 50) da idade para cada tipo de SCCmec. A linha vertical que atravessa a caixa conecta os valores adjacentes superior (95%) e inferior (5%) da distribuição das idades.

4.2.5. Perfis genotípicos dos tipos de SCCmec

As Figuras 3, 4 e 5 mostram os principais perfis genotípicos encontrados. A análise das amostras contendo SCCmec tipos I, III e IV pela técnica de PFGE mostrou 3 clusters principais, com mais de 80% de similaridade pelo coeficiente de Dice.

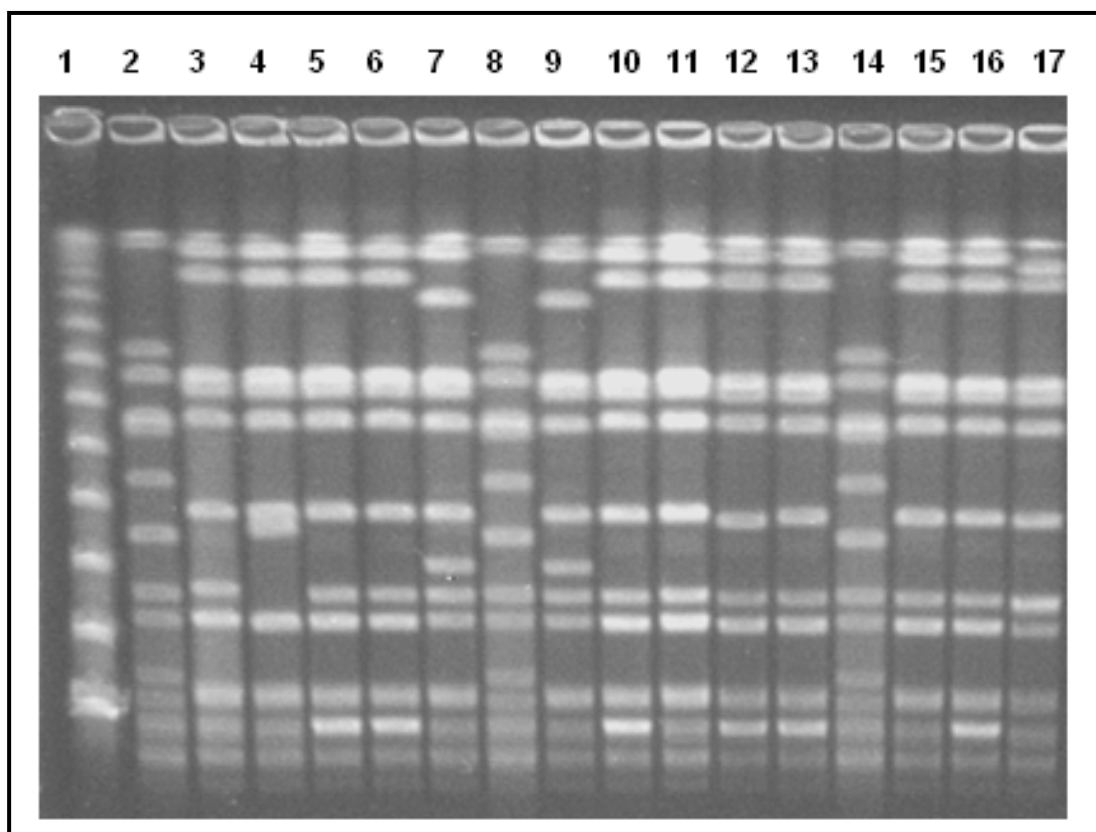


Figura 3. Perfil de bandas de amostras MRSA por técnica de eletroforese em campo pulsado. Canaleta 1: marcador de peso molecular 48,5kb (Lambda ladder); canaletas 2, 8 e 14: cepa padrão *Staphylococcus aureus* NCTC 8325; canaletas 3-7, 9-13, e 15-17: isolados MRSA SCCmec IV com mais de 80% de similaridade à cepa do clone pediátrico HDE 288.

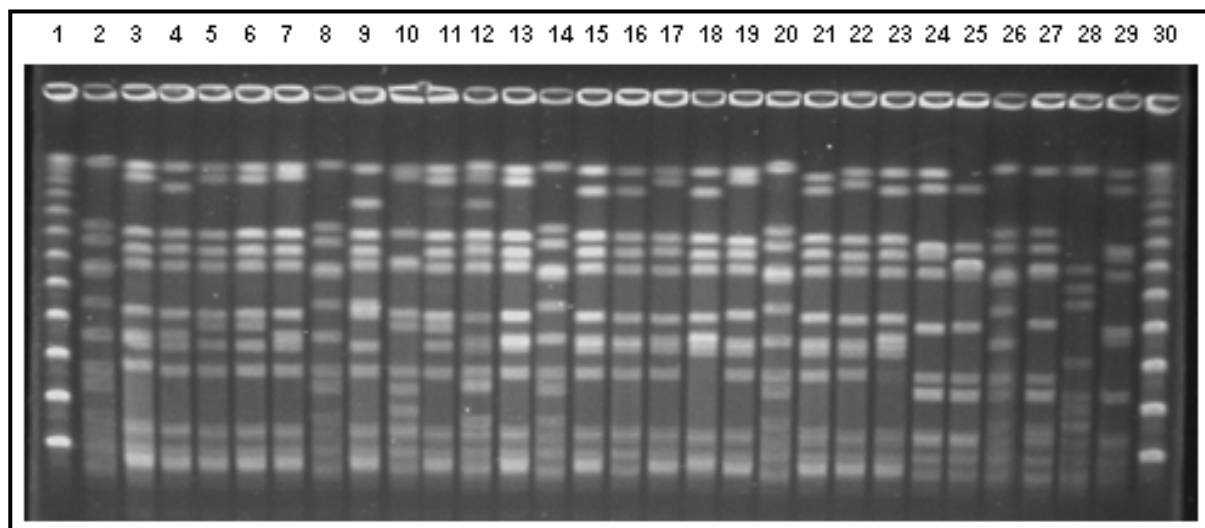


Figura 4. Perfil de bandas de amostras MRSA por técnica de eletroforese em campo pulsado. Canaletas 1 e 30: marcador de peso molecular 48,5kb (Lambda ladder); canaletas 2, 8, 14, 20 e 26: cepa padrão *Staphylococcus aureus* NCTC 8325; canaletas 3-7, 9-13, e 15-19, 21 a 23: isolados MRSA SCCmec I. Canaletas 24, 25 e 29: isolados MRSA SCCmec IV com mais de 80% de similaridade à cepa do clone pediátrico HDE288. Canaleta 28: isolado MRSA SCCmec IVc com perfil distinto do clone pediátrico.

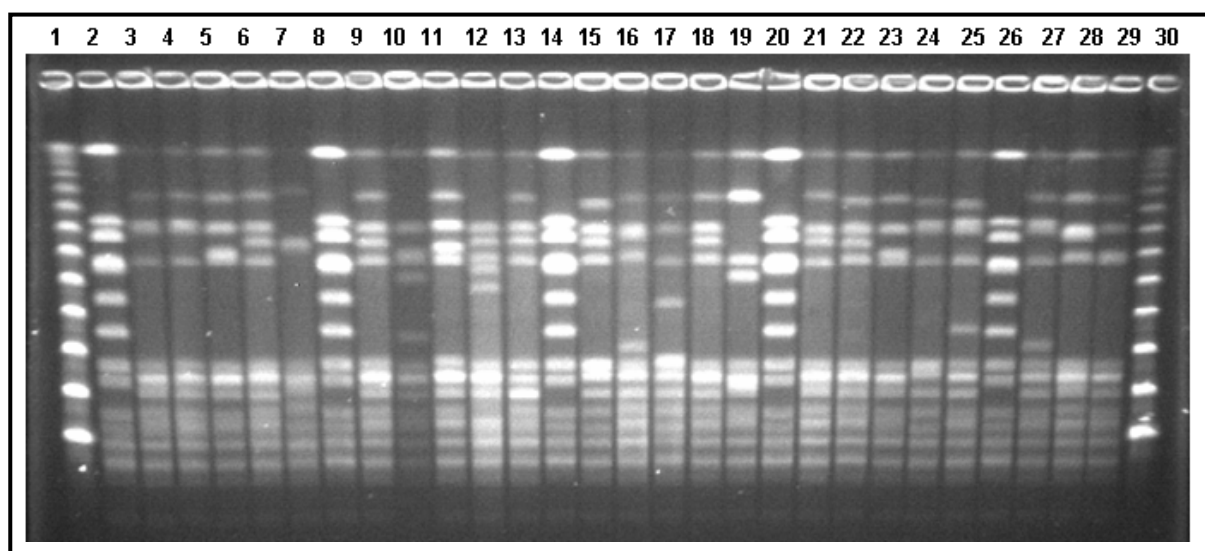


Figura 5. Perfil de bandas de amostras MRSA por técnica de eletroforese em campo pulsado. Canaletas 1 e 30: marcador de peso molecular 48,5kb (Lambda ladder); canaletas 2, 8, 14, 20 e 26: cepa padrão *Staphylococcus aureus* NCTC 8325; canaletas 3-7, 9-11, 13, 15-18, 21-25, 27-29: isolados MRSA SCCmec III com mais de 80% de similaridade à cepa do clone epidêmico brasileiro HU25. Canaleta 12: isolado MRSA SCCmec III com perfil distinto da cepa HU25.

Entre as 23 amostras *SCCmec* tipo I, 21 pertenciam ao mesmo genótipo, com similaridade total de 80.2% (Figura 6). Este dendograma revelou também que várias destas amostras eram idênticas entre si, com similaridade de 100%. A única amostra com *SCCmec* tipo I isolada no Brasil não pertencia a este cluster.

O padrão de PFGE apresentado por este grupo clonal foi comparado com os padrões das 17 amostras controles internacionais utilizadas neste estudo, porém nenhuma cepa idêntica ou similar foi encontrada no banco de dados do programa Bionumerics. Entretanto, foi localizado na literatura um clone denominado Chile/Cordoba, descrito recentemente na Argentina e Chile, contendo *SCCmec* tipo I (Sola et al. 2006; Sola et al. 2002). A imagem do gel de PFGE contendo este clone e representantes da cepa NCTC 8325 foram inseridas no programa Bionumerics para cálculo da posição e tamanho das bandas deste clone latino-americano. Após processamento das imagens, verificou-se que o tamanho e posição das bandas eram muito semelhantes aos obtidos pelo presente estudo para amostras *SCCmec* I (Figura 7). Nota-se que, em 1997, amostras compatíveis genotipicamente com o clone Chile/Córdoba já estavam presentes na Argentina e no Chile.

Entre as 26 amostras *SCCmec* tipo IV, a maioria pertencia a um único cluster, com 80,9% de similaridade (Figura 8). Entre as linhagens internacionais de *SCCmec* IV e VI incluídas para comparação, este cluster apresentou maior similaridade com o clone denominado pediátrico (amostra controle HDE 288). Nota-se que as duas primeiras amostras com este genótipo foram identificadas em 1997, em Buenos Aires e em São Paulo.

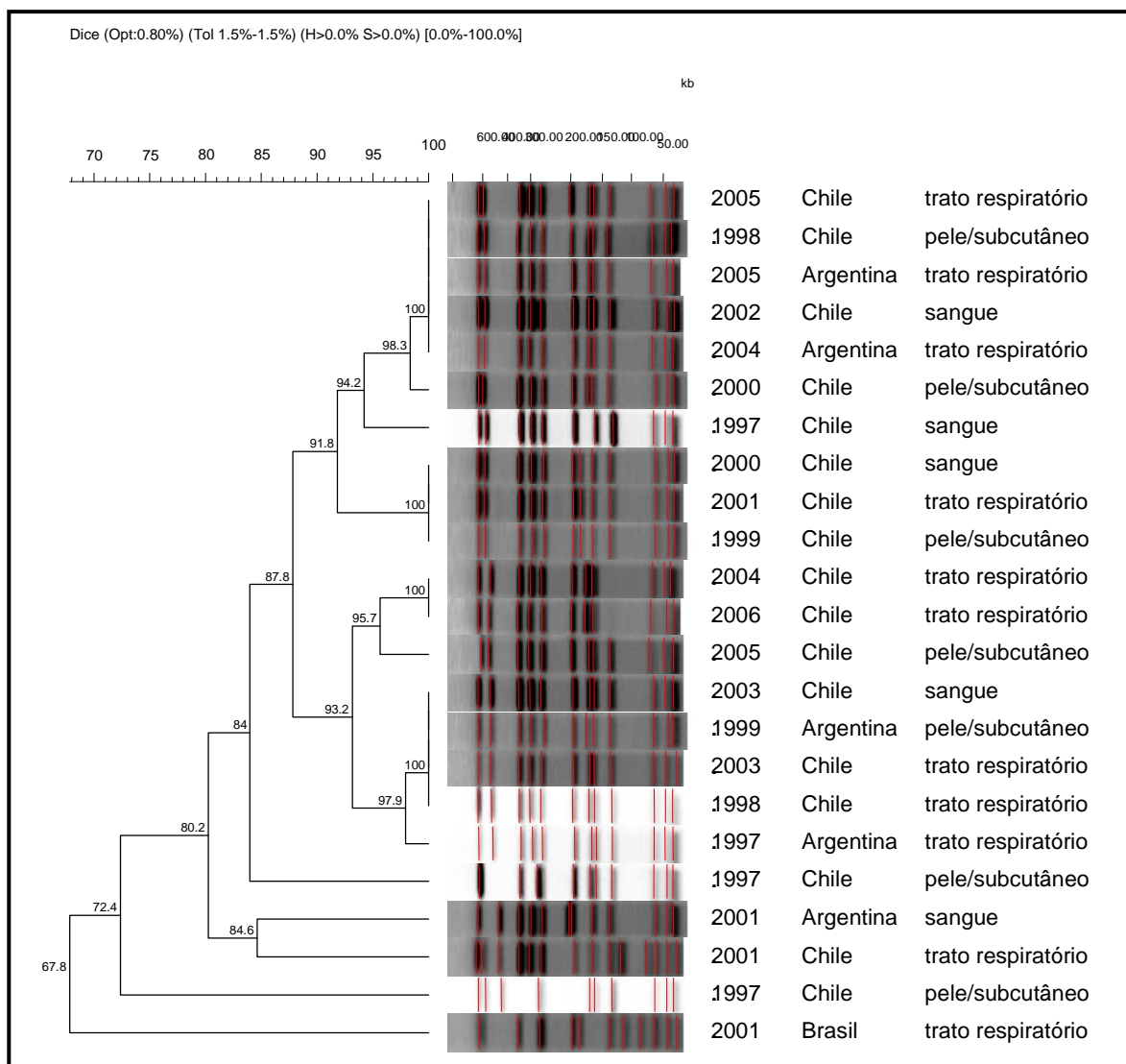


Figura 6. Análise de clusters das amostras contendo *SCCmec I*, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao ano de isolamento, país e sítio de infecção de cada isolado bacteriano.

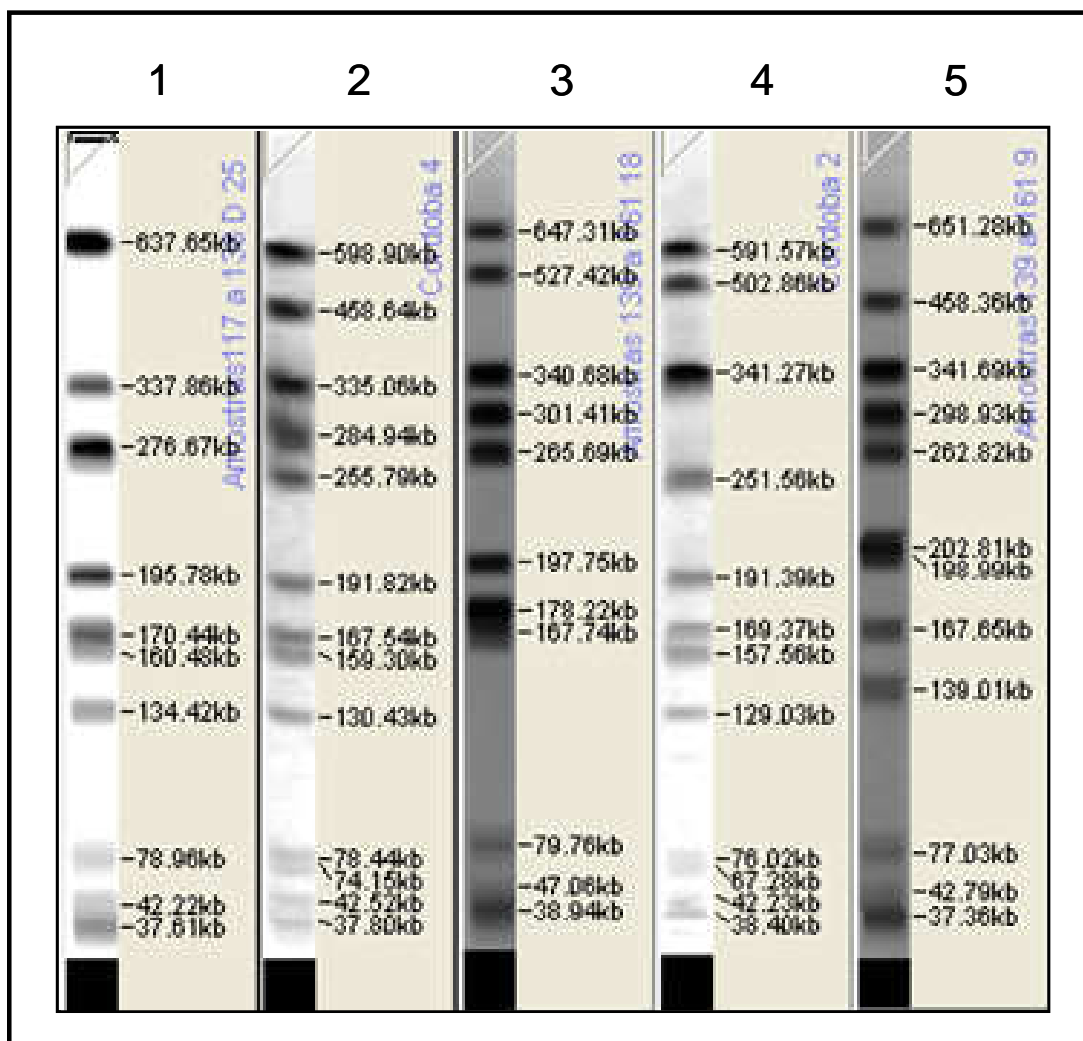


Figura 7. Tamanho (em kb) e posição das bandas de cepas representantes do clone Chile/Cordoba SCCmec I, e comparação com amostras do presente estudo. O cálculo do tamanho aproximado das bandas foi realizado pelo programa Bionumerics. Colunas 2 e 3: amostras SCCmec I pertencentes ao clone Chile/Cordoba (Figura 3 de Sola et al. 2006). Colunas 1, 4 e 5: amostras SCCmec I pertencentes ao cluster SCCmec I encontradas no presente estudo.

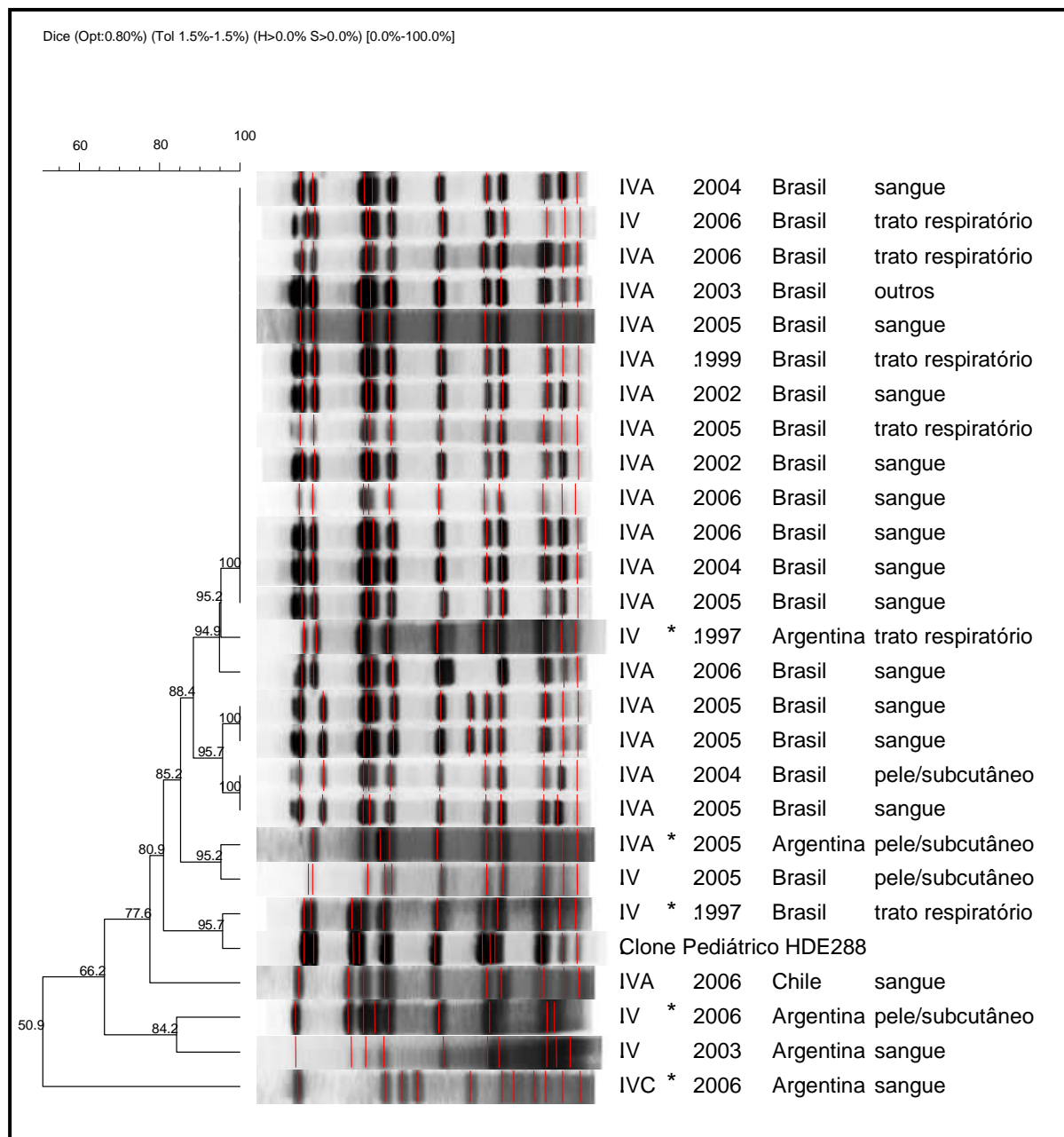


Figura 8. Análise de clusters das amostras contendo *SCCmec* IV, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao tipo/subtipo de *SCCmec*, ano de isolamento, país e sítio de infecção de cada isolado bacteriano. As amostras com "*" são positivas para PVL.

Três das amostras SCC*mec* tipo III foram não tipáveis pela técnica de PFGE. A maioria das 134 amostras tipáveis apresentou mais de 80% de similaridade com a amostra HU25, do CEB (Figuras 9a e 9b). Entretanto, ao se estratificar por períodos, verificou-se que 84,1% dos MRSA analisados entre 1997 e 2001 eram semelhantes ao CEB, proporção maior que o período posterior (2002-2006), no qual 78,8% eram semelhantes a este clone. Adicionalmente, a proporção de MRSA com mais de 90% de similaridade ao CEB diminuiu de 69,7% (1997-2001), para apenas 10,7% (2002-2006), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0005$).

Entre as sete amostras positivas para a região *dcs*, apenas uma, isolada na Argentina em 2006, apresentava mais de 80% de similaridade com a amostra HDE288, porém a mesma foi negativa para *ccrAB4*. Duas amostras de Buenos Aires eram idênticas entre si e semelhantes a representantes do clone Chile/Córdoba. As demais amostras não pertenciam a nenhum clone específico.

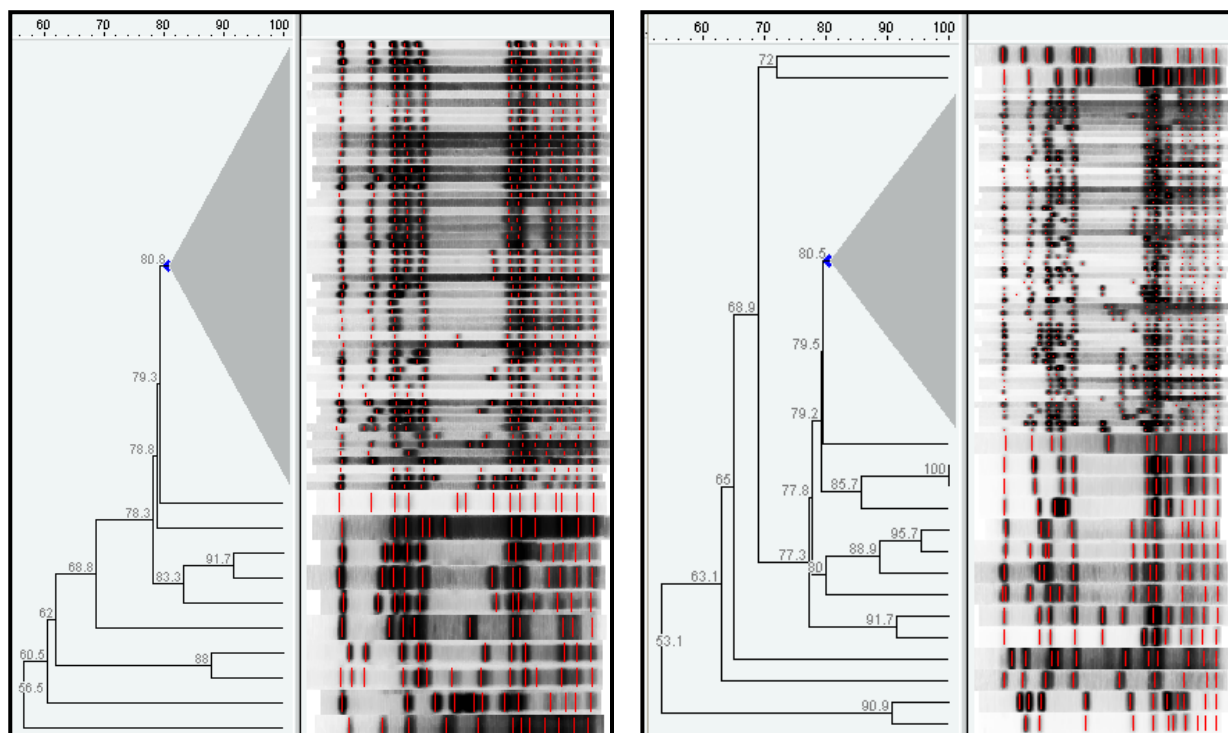


Figura 9a

Figura 9b

Figura 9. Análise de clusters das amostras contendo *SCCmec III*, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. A figura 9a corresponde às amostras analisadas 1997 e 2001; a figura 9b corresponde às amostras analisadas entre 2002 e 2006. Os ramos colapsados (triângulo invertido) correspondem às amostras com mais de 80% de similaridade com o clone epidêmico brasileiro.

5. DISCUSSÃO

A presente investigação possibilitou comparar características de MRSA selecionados entre dois diferentes perfis de sensibilidade, obtidos de um programa internacional de vigilância em sete centros médicos da América Latina. Este estudo adiciona novos elementos no conhecimento atual de infecções por MRSA na América Latina, tais como: (i) a predominância de amostras *SCCmec* tipo III no perfil MR-MRSA, e tipos I e IV no perfil MS-MRSA; (ii) a ausência de representantes dos tipos II e V entre as amostras analisadas na Argentina, Brasil e Chile; (iii) a constatação da apenas três linhagens clonais predominantes, relacionadas com tipos específicos de *SCCmec*; (iv) a heterogeneidade na distribuição dos genótipos e tipos de *SCCmec* entre os países avaliados.

Há algumas décadas, isolados clínicos de MRSA eram considerados em sua maioria multirresistentes e exclusivamente derivados de ambientes hospitalares. Os primeiros relatos de infecções por amostras CA-MRSA foram descritos em pacientes sem fatores de risco aparentes para IRAS. Como o presente estudo não teve como objetivo empregar definições clínicas para a caracterização destas infecções, optamos por não utilizar o termo "CA-MRSA". Entretanto, é importante lembrar que nem sempre as informações epidemiológicas dos pacientes estão prontamente disponíveis para consulta, sendo necessário a adoção de critérios de triagem rápidos e de fácil acesso aos médicos assistentes e pesquisadores, para auxiliar a distinção entre CA-MRSA ou HA-MRSA. Portanto, com a recente mudança do perfil epidemiológico deste patógeno, a definição e caracterização dos fenótipos de sensibilidade passaram a ser considerados os primeiros passos para a delimitação de diferentes populações de MRSA.

Para o presente estudo foram selecionados dois perfis distintos de sensibilidade, a partir da revisão de critérios MR-MRSA ou MS-MRSA utilizados em investigações anteriores. Verificou-se, entretanto, a ausência de uma padronização específica, sendo a definição "multirresistente" ou "multissensível" heterogênea entre os estudos de MRSA (Gosbell et al. 2003; van der Mee-Marquet et al. 2007). Poucos estudos de vigilância relataram a distribuição de co-resistências em amostras MRSA isoladas em países na América do Sul. Um único estudo nesta região revelou que amostras isoladas no final da década de 90 teriam um perfil de co-resistência mais amplo que de outras localidades geográficas (Diekema et al. 2001). Sabe-se também que o CEB, epidêmico em vários países da América Latina, geralmente expressa resistência *in vitro* à maioria dos compostos não β -lactâmicos utilizados na prática clínica. Portanto, para o presente estudo, caracterizou-se como "multirresistente" isolados clínicos resistentes a pelo menos seis dos oito antimicrobianos não β -lactâmicos testados.

O mesmo racional acima vale para a definição de amostras MRSA "multissensíveis", ou "NORSA" ("non-nonmultiresistant MRSA"), as quais também sofrem variações no perfil fenotípico dependendo da seleção dos antimicrobianos para análise (Trindade et al. 2005; van der Mee-Marquet et al. 2004). Isolados sensíveis à clindamicina e ciprofloxacina, independente do resultado *in vitro* dos outros compostos, foram considerados NORSA em recente publicação na Suíça (Francois et al. 2008). Na França, resistência a no máximo três compostos não β -lactâmicos foi o critério utilizado para definir NORSA entre amostras de hemoculturas (van der Mee-Marquet et al. 2004; van der Mee-Marquet et al. 2007). Nos Estados Unidos, representantes do USA300, o clone predominante MS-MRSA, são em sua maioria resistentes à eritromicina (Diep et al. 2006; Tenover et al. 2006). No Brasil, Trindade e colaboradores encontraram somente 20% de amostras NORSA sensíveis à eritromicina em um hospital de São

Paulo (Trindade et al. 2005). Portanto, a resistência à eritromicina foi o marcador inicial utilizado em nosso estudo a fim de detectar isolados fenotipicamente NORSA ou MS-MRSA, além de resistência a no máximo três dos demais agentes não β -lactâmicos.

É importante observar que selecionamos para análise amostras representativas de dois perfis de sensibilidade específicos, os quais correspondem a 70% das amostras MRSA coletadas entre 1997-2006 nos sete centros médicos participantes do Programa SENTRY. O restante das amostras (30%) não foi incluído, por apresentarem perfis distintos de MS-MRSA ou MR-MRSA. Portanto, os resultados derivados das 197 amostras MRSA devem ser sempre interpretados em conjunto com os perfis de sensibilidade correspondentes.

A carência de estudos longitudinais na América Latina, analisando tipos de *SCCmec* e linhagens clonais representativas de longos períodos, dificulta a comparabilidade de nossos resultados. Sola e colaboradores caracterizaram um clone local na Argentina, porém investigaram isolados MRSA em apenas dois anos não consecutivos (1999 e 2001) (Sola et al. 2006; Sola et al. 2002). Estudo recente no Paraguai também relacionou tipos de *SCCmec* a perfis fenotípicos, porém somente incluiu isolados de MRSA detectados no ano de 2005 (Mayor et al. 2007). Nos Estados Unidos e Europa, estudos recentes detectaram a emergência de perfis mais sensíveis ao longo de mais de dez anos de vigilância. Dados do Programa NNIS mostraram que a frequência de isolados resistentes somente à eritromicina aumentou de 4,0% em 1992 para 14,7% em 2003, paralelamente à diminuição dos fenótipos mais resistentes (Klevens et al. 2006a). Os autores atribuíram este fenômeno à substituição dos clones resistentes por isolados das linhagens USA300 e USA400, classicamente associadas a infecções CA-MRSA nos Estados Unidos. Em um hospital francês, a maior prevalência de isolados multissensíveis após 1997 foi relacionada ao aparecimento de amostras

SCC*mec* IV, sensíveis à gentamicina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima (Donnio et al. 2004). Apesar de empregarem a técnica de PFGE, os autores não conseguiram caracterizar nenhum clone específico que fosse responsável pelo aumento de amostras tipo IV.

Assim como nos Estados Unidos e na Europa, os genótipos detectados nos sete centros latino-americanos apresentaram relação direta com os diferentes perfis de sensibilidade. Um único grupo clonal foi predominante entre as amostras SCC*mec* I, associado a MS-MRSA. Como não dispomos de uma amostra controle do clone Chile/Córdoba para inclusão nos experimentos de tipagem molecular, a presença desta linhagem entre nossas amostras não pode ser afirmada categoricamente. Entretanto, duas evidências são favoráveis a esta hipótese: (i) o cálculo do peso e posição de bandas executado pelo programa Bionumerics; (ii) as semelhanças fenotípicas com os representantes originais deste clone.

Apesar da linhagem Chile/Córdoba ser considerada hospitalar, seus representantes são geralmente mais sensíveis aos não β -lactâmicos que o CEB, sendo sensíveis à sulfametoxazol-trimetoprima, resistentes à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e com resistência variável à gentamicina, cloranfenicol, rifampicina e tetraciclina (Sola et al. 2006). Em nossa amostragem, a combinação MS-MRSA/SCC*mec* I encaixou-se nestas características, com a maioria das amostras expressando resistência somente a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e gentamicina. Quatro amostras apresentaram sensibilidade à gentamicina, sendo resistentes a somente três dos agentes testados. Sola e colaboradores também detectaram este perfil em duas amostras na Argentina, sugerindo que a perda do gene *aac6-aph2* poderia ser o mecanismo associado. Seria interessante confirmar esta hipótese em nossas amostras,

avaliando futuramente a presença de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.

A sensibilidade a sulfametoxazol-trimetoprima foi sugerida como um marcador para diferenciar amostras Chile/Córdoba do CEB em regiões com alta prevalência destes dois clones (Sola et al. 2006). Identificamos duas amostras resistentes a este antimicrobiano, possivelmente relacionadas ao Chile/Córdoba, indicando que esta abordagem deve ser utilizada com cautela nestas localidades.

A primeira identificação de representantes deste clone teve origem no Chile no final da década de 90, porém não foi detectado um comportamento epidêmico nestas amostras, e as mesmas foram classificadas como pertencentes a um clone local esporádico pelos pesquisadores portugueses (Aires de Sousa M. et al. 2001). Na Argentina, Sola e colaboradores relataram a presença deste clone a partir de 1999 somente na cidade de Córdoba (Sola et al. 2006; Sola et al. 2002). Os autores concluíram que o mesmo foi o responsável pelo declínio e gradativa substituição do CEB em vários hospitais desta cidade. Este fenômeno teria se iniciado em 1999 e se consolidado em 2001, período a partir do qual a maioria dos isolados hospitalares de MRSA desta região já pertencia a este genótipo emergente.

Ao se supor a origem Chile/Córdoba de nossas amostras, alguns conceitos sedimentados pelos pesquisadores argentinos e portugueses deveriam ser revistos: (i) a denominação do clone como "Córdoba", por ter sido inicialmente identificado nesta localidade; (ii) a natureza esporádica desta linhagem no Chile; (iii) a conclusão que este clone se originou no Chile em 1997-1998, tendo então se disseminado para a Argentina somente a partir de 1999. No presente estudo, os primeiros isolados clínicos possivelmente relacionados a este clone latino-americano foram identificados em Santiago e em Buenos Aires já em 1997. Estas novas

informações mostram que não seria possível inferir em qual país emergiram os primeiros representantes deste genótipo. Buenos Aires e Córdoba são cidades separadas por mais de 600 km, porém fazem parte de províncias vizinhas, o que pode ter contribuído para a disseminação de amostras MRSA entre as mesmas no final da década de 90. Portanto, a substituição do CEB, outrora o clone local hospitalar predominante, pode ter se iniciado pelo menos dois anos antes do relatado pelos pesquisadores argentinos.

No Chile, este clone esteve presente em todos os anos avaliados, indicando um evidente potencial epidêmico do mesmo neste país. A alta acurácia da combinação MS-MRSA/SCC*mec* I indicaria que a presença do perfil MS-MRSA no Chile está provavelmente relacionada à disseminação deste clone, pelo menos nos dois centros médicos de Santiago. O perfil desta linhagem, mais sensível e carregando menos determinantes de resistência que o CEB, pode ter representado uma vantagem adaptativa para sua expansão na Argentina e Chile.

Ao contrário da Argentina e Chile, a presença de MS-MRSA nos hospitais brasileiros ocorreu quase exclusivamente à custa de amostras carregando o tipo IV de SCC*mec*. Diferentemente do padrão Chile/Córdoba, a maioria expressava resistência somente à eritromicina, consistente com o perfil multissensível do clone pediátrico, ou USA800. A amostra identificada em 1997 em São Paulo é a mais antiga representante desta linhagem já reportada em nosso país, antecedendo os relatos de Miranda, Rozenbaum e, provavelmente, Melo e colaboradores (de Miranda et al. 2007; Melo et al. 2004; Rozenbaum et al. 2006). Adicionalmente, a amostragem destes pesquisadores brasileiros era predominantemente colonizante, impedindo inferências sobre o potencial invasivo desta linhagem no Brasil. O estudo conduzido por Trindade e colaboradores foi o primeiro a detectar no Brasil amostras tipo IV com perfil NORSA em hemoculturas; entretanto, as mesmas não foram relacionadas a nenhum clone específico

(Trindade et al. 2005). No presente estudo, a maioria dos isolados com mais de 80% de similaridade à amostra HDE288 era proveniente de infecções de corrente sanguínea, evidenciando, portanto, a patogenicidade desta linhagem em nosso país.

Isolados clínicos de *S. aureus* tipo IV são classicamente reportados como originários da comunidade, com perfil MS-MRSA devido à ausência de outros determinantes de resistência em seu elemento genético móvel. A história natural de várias destas linhagens compreende sua identificação inicial no ambiente comunitário, seguida de detecção das mesmas infectando pacientes hospitalizados, eventualmente substituindo clones locais multirresistentes. Este parece ter sido o caminho seguido pelo genótipo CA-MRSA USA300 em vários hospitais dos Estados Unidos, e pelo EMRSA-15 na Europa (Amorim et al. 2007) (Seybold et al. 2006). Apesar de conter SCC*mec* tipos IV ou VI, o clone pediátrico parece representar exceção a este preceito, já que os primeiros relatos em Portugal já caracterizavam esta linhagem como hospitalar (Sa-Leao et al. 1999). O inesperado padrão fenotípico do clone pediátrico foi atribuído por alguns autores à política de uso restrito de antimicrobianos, freqüentemente preconizada em instituições pediátricas. Este procedimento limitaria a pressão seletiva nestes isolados, tornando estes ambientes hospitalares reservatórios propícios para a manutenção e disseminação dos mesmos (Sa-Leao et al. 1999).

É notável em nossa amostragem a não detecção de linhagens SCC*mec* IV classicamente comunitárias, como SWP, USA300 e 400, Estes resultados não significam necessariamente a ausência destes elementos nas cidades avaliadas, pois alguns representantes destes clones já foram detectados no Brasil (Ribeiro et al. 2005a; Ribeiro et al. 2007). Seria mais provável assumir estes dados como um reflexo dos critérios de seleção adotados por nosso estudo. A baixa freqüência de PVL foi um dos primeiros indícios de uma provável origem nosocomial de nossos isolados, pois a maioria

das amostras tipo IV confirmadas como CA-MRSA teriam o potencial de produzir esta leucocidina. Para ratificar esta hipótese, nossa amostragem teria que ser submetida a análises adicionais, desenhadas para avaliar fatores de risco para IRAS estratificando os casos pelos tipos correspondentes de SCC*mec*.

A mediana de idade dos pacientes infectados com SCC*mec* IV em nossa amostragem foi significativamente menor em comparação às amostras tipos I e III. As amostras USA800 identificadas no Rio de Janeiro colonizavam duas crianças de três e oito anos de idade (de Miranda et al. 2007). No trabalho de Trindade e colaboradores, a média de idade dos pacientes infectados por NORSA em São Paulo era de apenas 28 anos, e vários estavam internados em unidades neonatais (Trindade et al. 2005). Estes achados indicam uma predileção dos representantes brasileiros tipo IV e/ou clone pediátrico por populações mais jovens, semelhante ao ocorrido em Portugal. Este fato é preocupante, pois indivíduos colonizados por estas cepas patogênicas já foram identificados em nosso país. Após alta hospitalar, as crianças colonizadas poderiam representar potenciais reservatórios deste clone para o ambiente comunitário por estarem especialmente expostas a situações de aglomeração, como berçários e creches. As vantagens adaptativas supostamente comuns a todas as linhagens de SCC*mec* IV, como maior potencial para transferência horizontal e rapidez de multiplicação, representariam riscos adicionais para a transmissão destas amostras na comunidade.

Valores inferiores de CIM para oxacilina são citados por vários pesquisadores como característicos de amostras tipo IV. Entretanto, a maioria destas publicações inclui somente os valores máximo e mínimo em µg/ml, impossibilitando assumir um valor médio para comparabilidade entre diferentes estudos e populações bacterianas (Qi et al. 2005; Vandenesch et al. 2003; Vivoni et al. 2006). Os valores de

CIM para oxacilina foram determinados para todas as 26 amostras tipo IV, culminando em uma média geométrica de 45,1 µg/ml, o que representaria 64 µg/ml na escala logarítmica utilizada para ágar diluição ou microdiluição em caldo. Estes valores são inferiores aos tipicamente descritos na literatura para *SCCmec* tipos I e III, o que indicaria que a determinação da CIM para oxacilina poderia ser utilizada como um dos marcadores fenotípicos da presença de *SCCmec* IV nos centros avaliados.

Entre as 24 amostras MS-MRSA no Brasil, somente quatro não continham *SCCmec* IV. Este achado nos permite assumir que amostras MRSA identificadas em nosso país com este fenótipo têm grande possibilidade de carrear *SCCmec* IV e não outros tipos de elementos genéticos, conforme os resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Popovich e colaboradores basearam-se em resultados do antibiograma para tentar prever os resultados genotípicos de MRSA (Popovich et al. 2007). Porém, ao contrário de nosso estudo, os resultados de PFGE - e não *SCCmec* - foram utilizados como padrão ouro para definir o genótipo "hospitalar" e "comunitário". Os autores concluíram que a presença do genótipo "comunitário" estava mais freqüentemente associada à sensibilidade à clindamicina e fluoroquinolonas. Entretanto, os autores consideraram isolados USA800 (*SCCmec* IV) como pertencentes ao genótipo hospitalar, dificultando a comparação com nossos resultados, analisados de acordo com o tipo de *SCCmec*.

Um total de sete amostras amplificou somente para a região *dcs* e seriam consideradas *SCCmec* VI, de acordo com recente protocolo desenvolvido por Milheiriço e colaboradores (Milheirico et al. 2007). Entretanto, apenas uma foi semelhante ao clone pediátrico, e a mesma não possuía *ccrAB4*. Duas amplificaram para *ccrAB4*, porém não pertenciam ao clone pediátrico. Como o tipo VI foi somente descrito entre amostras deste clone, é pouco provável que algum destes sete isolados

contenha realmente o tipo VI. Esta inconsistência foi notada pelos próprios autores portugueses ao validar os resultados deste protocolo, pois duas amostras *SCCmec I* foram erroneamente categorizadas como tipo VI (Milheirico et al. 2007). Mais provavelmente, nossas amostras representam variantes dos tipos I ou IV, com deleções em outras regiões incluídas neste protocolo multiplex. Dois isolados de nossa coleção que amplificaram somente para a região *dcs* eram idênticos entre si e semelhantes por PFGE às amostras contendo *SCCmec I*, corroborando esta hipótese. As duas amostras que amplificaram para *ccrAB4* estão sendo motivo de estudos adicionais, para verificar a real procedência das mesmas.

A ausência de amostras *SCCmec* tipos V em nossa coleção merece ser objeto de análise. É pouco provável que nossos critérios de seleção tenham influenciado estes achados, pois as características fenotípicas de várias amostras tipo V detectadas em outras regiões se encaixariam em nosso perfil MS-MRSA. Amostras tipo V australianas, apesar de multissensíveis, podem expressar resistência à eritromicina (O'Brien et al. 2005). O clone *SCCmec V* classicamente reportado em Taiwan pode ter origem hospitalar ou comunitária, apresentando resistência à eritromicina e sensibilidade à ciprofloxacina, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprima (Chen et al. 2005). É possível, portanto, que estes elementos genéticos não tenham ainda se estabelecido nestes três países latino-americanos.

Os clones pediátrico e Chile/Córdoba foram previamente caracterizados por MLST como pertencentes ao ST5 (Enright et al. 2002; Sola et al. 2006). No Brasil, isolados similares ao clone Nova Iorque/Japão, também ST5, foram registrados no Rio de Janeiro (de Miranda et al. 2007) e em São Paulo (Antônio C. Pignatari, dados não publicados). Apesar de não termos empregado a técnica de MLST em nossas amostras, é interessante notar a presença deste complexo clonal circulante entre os três países,

indicando um ancestral genético comum. Estas observações nos levariam a questionar se a maioria dos isolados MRSA nestes três países não seria produto de apenas dois perfis alélicos: ST5 e ST239 (CEB).

O presente estudo mostrou que o CEB ainda representa a maioria das amostras de MRSA nos hospitais brasileiros. Entretanto, a proporção de amostras idênticas ao CEB por PFGE declinou nos últimos cinco anos do estudo, como consequência de uma maior diversidade genética em comparação com a amostra HU25, protótipo do primeiro representante do CEB. No Brasil, vários estudos descreveram a estabilidade do CEB, predominante em ambientes hospitalares. A maioria deste estudos, no entanto, avaliou a frequência de amostras do CEB em curtos períodos de tempo, em regiões geográficas específicas, dificultando a detecção de tendências de diversificação clonal (Aires de Sousa M. et al. 2001; Oliveira et al. 2001; Vivoni et al. 2006).

Um total de 15 anos se passaram desde a primeira detecção deste clone em 1993 por Sader e colaboradores na cidade de São Paulo (Sader et al. 1994). Portanto, a heterogeneidade temporal de perfis do CEB seria até presumida, porém somente agora documentada pelos resultados do presente estudo, representativo de 10 destes 15 anos. Em várias regiões geográficas, incluindo outros países da América Latina, isolados do CEB vêm sendo substituídos por outras linhagens clonais, com perfis fenotípicos mais sensíveis (Amorim et al. 2007; Sola et al. 2006). É difícil prever neste momento se esta pode ser a história natural do CEB nos hospitais brasileiros. Devido às dimensões continentais de nosso país, a continuidade de estudos de vigilância abrangentes, como o SENTRY, é de fundamental importância para avaliar alterações nas frequências e características das diferentes populações de MRSA.

6. CONCLUSÕES

- *SCCmec* tipos I, III e IV foram os mais freqüentemente isolados, com variações nas distribuições entre os países;
- As amostras MS-MRSA apresentaram predominantemente *SCCmec* I e IV, enquanto as amostras MR-MRSA carregavam em sua maioria *SCCmec* III, sugerindo que os perfis MS-MRSA e MR-MRSA possam ser utilizados como testes iniciais de triagem para detecção destes tipos de *SCCmec* nestas regiões geográficas;
- Detectou-se três linhagens genóticas predominantes: (i) clone epidêmico brasileiro (*SCCmec* III) nos três países, (ii) clone pediátrico (*SCCmec* IV) no Brasil e Argentina, (iii) e um clone contendo *SCCmec* I, provavelmente associado ao Chile/Córdoba na Argentina e Chile.

7. REFERÊNCIAS

Aires de Sousa M., Miragaia, M., Sanches, I.S., Avila, S., Adamson, I., Casagrande, S.T., Brandileone, M.C., Palacio, R., Dell'Acqua, L., Hortal, M., Camou, T., Rossi, A., Velazquez-Meza, M.E., Echaniz-Aviles, G., Solorzano-Santos, F., Heitmann, I. and de Lencastre, H. (2001) Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2197-2205.

Aires de S.M., de Lencastre H., Santos S., I, Kikuchi K., Totsuka K. and Tomasz A. (2000) 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.* **6**, 253-258.

Amorim M.L., Faria N.A., Oliveira D.C., Vasconcelos C., Cabeda J.C., Mendes A.C., Calado E., Castro A.P., Ramos M.H., Amorim J.M. and de Lencastre H. (2007) Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2881-2888.

Amorim M.L., Aires de S.M., Sanches I.S., Sa-Leao R., Cabeda J.M., Amorim J.M. and de Lencastre H. (2002) Clonal and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from a Portuguese hospital over time. *Microb. Drug Resist.* **8**, 301-309.

Bantar C., Famiglietti A. and Goldberg M. (2000) Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee; and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group. *Int. J. Infect. Dis.* **4**, 85-90.

Bonness S., Szekat C., Novak N. and Bierbaum G. (2007) Pulsed field gel electrophoresis of *Staphylococcus aureus* isolates from atopic patients reveals presence of similar strains on the children and their parents. *J. Clin. Microbiol.*

Boyle-Vavra S., Ereshefsky B., Wang C.C. and Daum R.S. (2005) Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4719-4730.

Chambers H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 781-791.

- Chen F.J., Lauderdale T.L., Huang I.W., Lo H.J., Lai J.F., Wang H.Y., Shiau Y.R., Chen P.C., Ito T. and Hiramitsu K. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1760-1763.
- Clin. Infect. Dis. (2006) Community-acquired MRSA among HIV-infected patients rapidly rising. *Clin. Infect. Dis.* **43**, iii.
- Clinical and Laboratories Standard Institute (2006) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Seventh edition. Approved Standard M7-A7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S17.
- Conceicao T., Aires-de-Sousa M., Fuzi M., Toth A., Paszti J., Ungvari E., van Leeuwen W.B., van B.A., Grundmann, H. and de Lencastre, H. (2007) Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 971-979.
- Coombs G.W., Nimmo G.R., Bell J.M., Huygens F., O'Brien F.G., Malkowski M.J., Pearson J.C., Stephens A.J. and Giffard P.M. (2004) Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4735-4743.
- Cuevas O., Cercenado E., Bouza E., Castellares C., Trincado P., Cabrera R. and Vindel A. (2007) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 250-256.
- de Miranda O.P., Silva-Carvalho M.C., Ribeiro A., Portela F., Cordeiro R.P., Caetano N., Vidal C.F. and Figueiredo A.M. (2007) Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1165-1172.
- Department of Health and Human Services, C. f. D. C. a. P. (2005) Community-associated MRSA information for clinicians. February 3, 2005. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.
- Deurenberg R.H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A. and Stobberingh E.E. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 222-235.

Dice L.R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. pp. 297-302.

Diekema D.J., Pfaller M.A. and Jones R.N. (2002) Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int. J. Antimicrob. Agents* **20**, 412-418.

Diekema D.J., Pfaller M.A., Schmitz F.J., Smayevsky J., Bell J., Jones R.N. and Beach M. (2001) 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.* **32 Suppl 2**, S114-S132.

Diep B.A., Gill S.R., Chang R.F., Phan T.H., Chen J.H., Davidson M.G., Lin F., Lin J., Carleton H.A., Mongodin E.F., Sensabaugh G.F. and Perdreau-Remington F. (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**, 731-739.

Dominguez M.A., de Lencastre H., Linares J. and Tomasz A. (1994) 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.* **32**, 2081-2087.

Donnio P.Y., Preney L., Gautier-Lerestif A.L., Avril J.L. and Lafforgue N. (2004) Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 808-813.

Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J. and Spratt B.G. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1008-1015.

Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H. and Spratt B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 7687-7692.

Esel D., Doganay M., Alp E. and Sumerkan B. (2003) Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 1038-1044.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). (2006) EARSS annual Report 2006. <http://www.earss.rivm.nl>. Acessado em janeiro 2008.

Felmingham D. (2002) The need for antimicrobial resistance surveillance. *J. Antimicrob. Chemother.* **50 Suppl S1**, 1-7.

Folden D.V., Machayya J.A., Sahmoun A.E., Beal J.R., Holzman G.S., Helgerson S.D. and Lo T.S. (2005) Estimating the proportion of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: two definitions used in the USA yield dramatically different estimates. *J. Hosp. Infect.* **60**, 329-332.

Francois P., Harbarth S., Huyghe A., Renzi G., Bento M., Gervaix A., Pittet D. and Schrenzel J. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Geneva, Switzerland, 1993-2005. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 304-307.

Gosbell I.B., Neville S.A., Mercer J.L., Fernandes L.A. and Fernandes C.J. (2003) Detection of intrinsic oxacillin resistance in non-multiresistant, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA). *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 468-470.

Graffunder E.M. and Venezia R.A. (2002) Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 999-1005.

Ho P.L., Cheung C., Mak G.C., Tse C.W., Ng T.K., Cheung C.H., Que T.L., Lam R., Lai R.W., Yung R.W. and Yuen K.Y. (2007) Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**, 145-151.

Hoban D.J., Biedenbach D.J., Mutnick A.H. and Jones R.N. (2003) Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**, 279-285.

Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C. and Hiramatsu K. (2001) Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1323-1336.

Ito T., Katayama Y. and Hiramatsu K. (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1449-1458.

- Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H. and Hiramatsu K. (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2637-2651.
- Jevons M.P. (1961) "Celbenin"-resistant staphylococci. pp. 124-125.
- Johnson A.P., Pearson A. and Duckworth G. (2005) Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 455-462.
- Jones R.N. and Masterton R. (2001) Determining the value of antimicrobial surveillance programs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **41**, 171-175.
- Katayama Y., Ito T. and Hiramatsu K. (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1549-1555.
- Kirby J.T., Fritsche T.R. and Jones R.N. (2006) Influence of patient age on the frequency of occurrence and antimicrobial resistance patterns of isolates from hematology/oncology patients: report from the Chemotherapy Alliance for Neutropenics and the Control of Emerging Resistance Program (North America). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**, 75-82.
- Klevens R.M., Edwards J.R., Tenover F.C., McDonald L.C., Horan T. and Gaynes R. (2006a) Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 389-391.
- Klevens R.M., Morrison M.A., Fridkin S.K., Reingold A., Petit S., Gershman K., Ray S., Harrison L.H., Lynfield R., Dumyati G., Townes J.M., Craig A.S., Fosheim G., McDougal L.K. and Tenover F.C. (2006b) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1991-1993.
- Kluytmans-Vandenbergh M.F. and Kluytmans J.A. (2006) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin. Microbiol. Infect.* **12 Suppl 1**, 9-15.
- Kollef M.H. and Micek S.T. (2005) *Staphylococcus aureus* pneumonia: a "superbug" infection in community and hospital settings. *Chest* **128**, 1093-1097.
- Kondo Y., Ito T., Ma X.X., Watanabe S., Kreiswirth B.N., Etienne, J. and Hiramatsu, K. (2007) Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 264-274.

- Krasagakis K., Samonis G., Maniatakis P., Georgala S. and Tosca A. (2006) Bullous erysipelas: clinical presentation, staphylococcal involvement and methicillin resistance. *Dermatology* **212**, 31-35.
- Lamaro-Cardoso J., Castanheira M., de Oliveira R.M., Silva S.A., Pignatari A.C., Mendes R.E., Pimenta F.C. and Andrade A.L. (2007) Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**, 467-470.
- Laupland K.B., Church D.L. and Gregson D.B. (2005) Blood cultures in ambulatory outpatients. *BMC. Infect. Dis.* **5**, 35.
- Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F. and Etienne J. (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1128-1132.
- Lowy F.D. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest* **111**, 1265-1273.
- Ma X.X., Galiana A., Pedreira W., Mowszowicz M., Christophersen I., Machiavello S., Lope L., Benaderet S., Buella F., Vincentino W., Albini M., Bertaux O., Constenla I., Bagnulo H., Llosa L., Ito T. and Hiramatsu K. (2005) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 973-976.
- Ma X.X., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R.S. and Hiramatsu K. (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1147-1152.
- Manfredi R., Calza L. and Chiodo F. (2002) Epidemiology and microbiology of cellulitis and bacterial soft tissue infection during HIV disease: a 10-year survey. *J. Cutan. Pathol.* **29**, 168-172.
- Maree C.L., Daum R.S., Boyle-Vavra S., Matayoshi K. and Miller L.G. (2007) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 236-242.
- Masterton R.G. (2000) Surveillance studies: how can they help the management of infection? *J. Antimicrob. Chemother.* **46 Suppl T2**, 53-58.

- Mayor L., Ortellado J., Menacho C., Lird G., Courtier C., Gardon C., Meugnier H., Bes M., Vandenesch F. and Etienne J. (2007) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asuncion, Paraguay. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2298-2300.
- McDougal L.K., Steward C.D., Killgore G.E., Chaitram J.M., McAllister S.K. and Tenover F.C. (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5113-5120.
- Melo M.C., 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. and Figueiredo A.M. (2004) 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.* **58**, 276-285.
- Melter O., Ires de S.M., Urbaskova P., Jakubu V., Zemlickova H. and de Lencastre L.H. (2003) Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4998-5005.
- Meyer E., Schwab F., Gastmeier P., Jonas D., Rueden H. and Daschner F.D. (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in German intensive care units during 2000-2003: data from Project SARI (Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Intensive Care Units). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**, 146-154.
- Micek S.T., Kollef K.E., Reichley R.M., Roubinian N. and Kollef M.H. (2007) Health care-associated pneumonia and community-acquired pneumonia: a single-center experience. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3568-3573.
- Milheirico C., Oliveira D.C. and de Lencastre H. (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3374-3377.
- Moet G.J., Jones R.N., Biedenbach D.J., Stilwell M.G. and Fritsche T.R. (2007) Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**, 7-13.
- Monnet D.L., MacKenzie F.M., Lopez-Lozano J.M., Beyaert A., Camacho M., Wilson R., Stuart D. and Gould I.M. (2004) Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1432-1441.

- Moreno C.A., Rosenthal V.D., Olarte N., Gomez W.V., Sussmann O., Agudelo J.G., Rojas C., Osorio L., Linares C., Valderrama A., Mercado P.G., Bernate P.H., Vergara G.R., Pertuz A.M., Mojica B.E., Navarrete M.P., Romero A.S. and Henriquez D. (2006) Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**, 349-356.
- Munckhof W.J., Schooneveldt J., Coombs G.W., Hoare J. and Nimmo G.R. (2003) Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in Queensland, Australia. *Int. J. Infect. Dis.* **7**, 259-264.
- Murchan S., Kaufmann M.E., Deplano A., de R.R., Struelens M., Zinn C.E., Fussing V., Salmenlinna S., Vuopio-Varkila J., El S.N., Cuny C., Witte W., Tassios P.T., Legakis N., van L.W., van B.A., Vindel A., Laconcha I., Garaizar J., Haeggman S., Olsson-Liljequist B., Ransjo U., Coombes G. and Cookson B. (2003) 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.* **41**, 1574-1585.
- Nguyen D.M., Mascola L. and Brancourt E. (2005) Recurring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a football team. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 526-532.
- Nimmo G.R., Schooneveldt J., O'Kane G., McCall B. and Vickery A. (2000) Community acquisition of gentamicin-sensitive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southeast Queensland, Australia. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3926-3931.
- NNIS (2004) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* **32**, 470-485.
- O'Brien F.G., Coombs G.W., Pearson J.C., Christiansen K.J. and Grubb W.B. (2005) Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5129-5132.
- Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J.D., Grubb W.B., Bell J.M., O'Brien F.G., Coombs G.W., Pearman J.W., Tenover F.C., Kapi M., Tiensasitorn C., Ito T. and Hiramatsu K. (2002) Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4289-4294.

- Oliveira D.C. and 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**, 2155-2161.
- Oliveira D.C., Milheirico C. and de Lencastre H. (2006) Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3457-3459.
- Oliveira D.C., Tomasz A. and de Lencastre H. (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 180-189.
- Oliveira D.C., Tomasz A. and de Lencastre H. (2001) The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.* **7**, 349-361.
- Ortega M., Almela M., Martinez J.A., Marco F., Soriano A., Lopez J., Sanchez M., Munoz A. and Mensa J. (2007) Epidemiology and outcome of primary community-acquired bacteremia in adult patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 453-457.
- Pan E.S., Diep B.A., Carleton H.A., Charlebois E.D., Sensabaugh G.F., Haller B.L. and Perdreau-Remington F. (2003) Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in California jails. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 1384-1388.
- Perez-Roth E., Lorenzo-Diaz F., Batista N., Moreno A. and Mendez-Alvarez S. (2004) Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4649-4656.
- Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V. and Kugler K. (1998) Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1762-1770.
- Phetsouvanh R., Phongmany S., Soukaloun D., Rasachak B., Soukhaseum V., Soukhaseum S., Frichithavong K., Khounnorath S., Pengdee B., Phiasakha K., Chu V., Luangxay K., Rattanavong S., Sisouk K., Keolouangkot V., Mayxay M., Ramsay A., Blacksell S.D., Campbell J., Martinez-Aussel B., Heuanvongsy M., Bounxouei B., Thammavong C., Syhavong B., Strobel M., Peacock S.J., White N.J. and Newton P.N. (2006) Causes of community-acquired bacteremia and patterns of antimicrobial resistance in Vientiane, Laos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 978-985.

- Popovich K., Hota B., Rice T., Aroutcheva A. and Weinstein R.A. (2007) Phenotypic prediction rule for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2293-2295.
- Qi W., Ender M., O'Brien F., Imhof A., Ruef C., McCallum N. and Berger-Bachi B. (2005) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5164-5170.
- Rennie R.P., Jones R.N. and Mutnick A.H. (2003) Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**, 287-293.
- Reynolds R., Potz N., Colman M., Williams A., Livermore D. and MacGowan A. (2004) Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 1018-1032.
- Ribeiro A., Coronado A.Z., Silva-Carvalho M.C., Ferreira-Carvalho B.T., Dias C., Rozenbaum R., Del Peloso P.F., da Costa Ferreira L.C., Teixeira L.A. and 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**, 339-345.
- Ribeiro A., Dias C., Silva-Carvalho M.C., Berquo L., Ferreira F.A., Santos R.N., Ferreira-Carvalho B.T. and Figueiredo A.M. (2005a) First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1985-1988.
- Ribeiro J., Boyce J.M. and Zancanaro P.Q. (2005b) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **9**, 52-55.
- Roberts R.B., Chung M., de Lencastre H., Hargrave J., Tomasz A., Nicolau D.P., John J.F., Jr. and Korzeniewski O. (2000) Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. *Microb. Drug Resist.* **6**, 245-251.

- Roberts R.B., de Lencastre H., Eisner W., Severina E.P., Shopsin B., Kreiswirth B.N. and Tomasz A. (1998) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group. *J. Infect. Dis.* **178**, 164-171.
- Robinson D.A. and Enright M.C. (2004) Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 92-97.
- Rosenthal V.D., Maki D.G., Salomao R., Moreno C.A., Mehta Y., Higuera F., Cuellar L.E., Arikian O.A., Abouqal R. and Leblebicioglu H. (2006) Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Ann. Intern. Med.* **145**, 582-591.
- Rozenbaum R., Silva-Carvalho M.C., Souza R.R., Melo M.C., Gobbi C.N., Coelho L.R., Ferreira R.L., Ferreira-Carvalho B.T., Schuenck A.L., Neves F.M., Silva L.R. and Figueiredo A.M. (2006) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disseminated in a home care system. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**, 1041-1050.
- Sa-Leao R., Santos S., Dias D., Peres I., Barros R.M. and de Lencastre H. (1999) 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.* **37**, 1913-1920.
- Sader H.S., Jones R.N., Gales A.C., Silva J.B. and Pignatari A.C. (2004) SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**, 25-79.
- Sader H.S., Jones R.N., Andrade-Baiocchi S. and Biedenbach D.J. (2002a) Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 273-280.
- Sader H.S., Jones R.N. and Silva J.B. (2002b) Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 281-288.
- Sader H.S., Pignatari A.C., Hollis R.J. and Jones R.N. (1994) Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **15**, 320-323.

- Salgado C.D., Farr B.M. and Calfee D.P. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 131-139.
- Seybold U., Kourbatova E.V., Johnson J.G., Halvosa S.J., Wang Y.F., King M.D., Ray S.M. and Blumberg H.M. (2006) Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 647-656.
- Shopsin B., Herring S. and Kreiswirth B.N. (2003) Hospital-acquired and community-derived: the future of MRSA? *Clin. Infect. Dis.* **37**, 151-152.
- Shukla S.K., Stemper M.E., Ramaswamy S.V., Conradt J.M., Reich R., Graviss E.A. and Reed K.D. (2004) Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3752-3757.
- Skiest D.J., Brown K., Cooper T.W., Hoffman-Roberts H., Mussa H.R. and Elliott A.C. (2007) Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. *J. Infect.* **54**, 427-434.
- Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973) Numerical taxonomy. pp. 573.
- Sola C., Cortes P., Saka H.A., Vindel A. and Bocco J.L. (2006) Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 192-200.
- Sola C., Gribaudo G., Vindel A., Patrino L. and Bocco J.L. (2002) Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1427-1435.
- Struelens M.J., Deplano A., Godard C., Maes N. and Serruys E. (1992) Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2599-2605.
- Tacconelli E., De A.G., Cataldo M.A., Pozzi E. and Cauda R. (2008) Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 26-38.

- Takano T., Saito K., Teng L.J. and Yamamoto T. (2007) Spread of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in Taipei, Taiwan in 2005, and comparison of its drug resistance with previous hospital-acquired MRSA. *Microbiol. Immunol.* **51**, 627-632.
- Tambyah P.A., Habib A.G., Ng T.M., Goh H. and Kumarasinghe G. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Singapore is usually "healthcare associated". *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**, 436-438.
- Teixeira L.A., Resende C.A., Ormonde L.R., Rosenbaum R., Figueiredo A.M., de Lencastre H. and Tomasz A. (1995) Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2400-2404.
- Tenover F.C., McDougal L.K., Goering R.V., Killgore G., Projan S.J., Patel J.B. and Dunman P.M. (2006) Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 108-118.
- Thompson K. and Torriani F. (2006) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the patient with HIV infection. *Curr. HIV. /AIDS Rep.* **3**, 107-112.
- Trindade P.A., Pacheco R.L., Costa S.F., Rossi F., Barone A.A., Mamizuka E.M. and Levin A.S. (2005) Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3435-3437.
- Udo E.E., Pearman J.W. and Grubb W.B. (1993) Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J. Hosp. Infect.* **25**, 97-108.
- van der Mee-Marquet, Domelier A.S., Girard N. and Quentin R. (2004) Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5650-5657.
- van der Mee-Marquet, Epinette C., Loyau J., Arnault L., Domelier A.S., Losfelt B., Girard N. and Quentin R. (2007) *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections changed significantly in 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 851-857.
- van Soolingen D., Hermans P.W., de Haas P.E., Soll D.R. and van Embden J.D. (1991) Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2578-2586.

- Vandenesch F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G.R., Heffernan H., Liassine N., Bes M., Greenland T., Reverdy M.E. and Etienne J. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 978-984.
- Velazquez-Meza M.E., Ires de S.M., Echaniz-Aviles G., Solorzano-Santos F., Miranda-Novales G., Silva-Sanchez J. and de Lencastre H. (2004) Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3877-3880.
- Vindel A., Trincado P., Gomez E., Cabrera R., Boquete T., Sola C., Valdezate S. and Saez-Nieto J.A. (2006) Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 266-270.
- Vivoni A.M., Diep B.A., de Gouveia Magalhaes A.C., Santos K.R., Riley L.W., Sensabaugh G.F. and Moreira B.M. (2006) Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1686-1691.
- Wang C.C., Lo W.T., Chu M.L. and Siu L.K. (2004) Epidemiological typing of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 481-487.
- Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Louie T. and Conly J.M. (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5026-5033.

ABSTRACT

Objectives: (i) to evaluate the SCC*mec* type distribution and the frequency of Pantone-Valentine leukocidin (PVL) gene among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) collected as part of a surveillance program from seven medical centers in Argentina, Brazil and Chile; (ii) to evaluate the relationship between SCC*mec* types and antimicrobial susceptibility profiles; (iii) to characterize the predominant MRSA clones in these medical centers, employing the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique. **Material and Methods:** All MRSA isolates from the seven participant centers, collected as part of the SENTRY Latin American Program during 1997-2006 were included. MRSA were stratified into two subgroups: multi-susceptible (MS-MRSA) and multi-resistant (MR-MRSA), according to *in vitro* susceptibility to selected non- β -lactam agents. Representative isolates of each subgroup, selected by year and country of isolation, were submitted to additional phenotypic and genotypic testing. SCC*mec* types were characterized by multiplex polymerase chain reaction, followed by *ccr* complex and PVL assessment if applicable. Clonal types were determined by PFGE. Demographic characteristics of infected patients were analyzed according to each SCC*mec* subgroup. **Results:** Overall, a total of 56 MS-MRSA and 141 MR-MRSA were evaluated. Most MS-MRSA harbored either SCC*mec* I (35,7%) or IV (46,4%); in contrast, SCC*mec* III prevailed among MR-MRSA. The majority of SCC*mec* I was detected in Argentina (n=5) and Chile (n=14). Among the 26 type IV isolates, most were identified in Brazil (n=20), only five carried the PVL gene and their mean oxacillin minimal inhibitory concentration (MIC) value was 45,1 μ g/ml. The band-based dendrogram clustered the Latin American MRSA strains into three distinct PFGE groups: the Brazilian epidemic clone (SCC*mec* III), the pediatric clone (SCC*mec* IV), and a lineage possibly related to the Chile/Cordoba clone (SCC*mec* I). **Conclusions:** Genetic and geographic diversity of SCC*mec* and clonal types were identified in the MRSA collection evaluated. Phenotypic susceptibility patterns (MS-MRSA and MR-MRSA) correlated well to specific SCC*mec* types in the geographic regions evaluated.
