

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Mariana de Azevedo Andrade

**Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus*
Meticilina Sensíveis e Meticilina Resistentes Isolados de
Amostras Clínicas**

**Recife
2013**

Mariana de Azevedo Andrade

**Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus*
Meticilina Sensíveis e Meticilina Resistentes Isolados de
Amostras Clínicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

**Recife
2013**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Andrade, Mariana de Azevedo

Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* metilina sensíveis e metilina resistentes isolados de amostras clínicas / Mariana de Azevedo Andrade. – Recife: O Autor, 2013.

129 folhas: il.

Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. **Bactérias 2. Staphylococcus aureus I. Balbino, Tereza Cristina Leal (orient.) II. Título.**

579.353

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-095

Mariana de Azevedo Andrade

**Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* Meticilina
Sensíveis e Meticilina Resistentes Isolados de Amostras Clínicas**

Aprovado em 29/05/2013

Banca Examinadora:

Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/Fiocruz

Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco (UPE)

Dra. Marinalda Anselmo Vilela
Universidade de Pernambuco (UPE)

Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Recife

2013

Dedico este trabalho a Deus, senhor de toda sabedoria, aos meus pais, que me concederam a dádiva da vida, o amor, o aprendizado e a excelente criação e ao meu marido, que caminha ao meu lado com amor em todos os momentos.

Agradecimentos

Pelo trabalho

À minha orientadora, Dra. Tereza Cristina, não apenas pela orientação e confiança, mas também pela amizade, carinho e incentivo ao longo de todos esses anos. Muito obrigada por confiar no trabalho e na realização do mesmo.

Ao Dr. Lee H. Harrison pela orientação durante o Doutorado-sanduíche, pela oportunidade concedida e por acreditar e confiar no trabalho.

À Dra. Jane Marsh, Jessica Schlackman, Dra. Mary Krauland, Scott Curry e toda a equipe do Public Health Infectious Disease Laboratory (PHIDL) da Universidade de Pittsburgh pelos ensinamentos, apoio nos experimentos e amizade.

À Ana Carolina Luz, não só pelo empenho e dedicação constante ao projeto, tornando-se meu braço direito nesta empreitada, como pela amizade e carinho de irmã.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz), Universidade de Pittsburgh- PA/EUA, FACEPE, CAPES, CNPq e Fogarty International Center Global Infectious Diseases Research Training Program Grant, National Institutes of Health (NIH)/EUA pela infraestrutura e apoio financeiro.

À Bárbara Cavalcanti e Tiago Barros por contribuírem nos experimentos para realização do trabalho.

Aos meus queridos amigos Carina Mendes, Diogo Chalegre, Felipe Lira, Paloma Barros, Rosanny Holanda e Vladimir Filho pelo valioso compartilhamento do conhecimento científico, debates, ajuda nos experimentos, amizade e pelos “almoços científicos”, que tanto nos auxiliaram na construção do saber.

À minha amiga Mariana Marques pelo incentivo, amizade, apoio e troca de conhecimento constante durante todos esses anos.

À Dra. Nilma Leal, Dra. Maria Betânia Melo, Dra. Marise Sobreira, Dr. Osvaldo Pompílio, Dr. Christian Reis, Dr. Valdir Balbino e Fernanda Pimentel pelo apoio e incentivo durante todos esses anos.

À Silvana Santos, Fabiana Laura e toda a equipe técnico-científica do Departamento de Microbiologia do CPqAM.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação em Genética-UFPE e da biblioteca do CPqAM sempre dispostos a ajudar.

A todos os membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com este trabalho.

Pelo incentivo

A Deus por me abençoar e me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ailton e Elisabeth, por toda dedicação, amizade, amor e incentivo. Sempre pacientes nos momentos difíceis, companheiros para todas as horas e pessoas de caráter inestimável. Sem vocês eu não estaria realizando este trabalho. Sou imensamente grata por tê-los sempre ao meu lado.

Ao meu marido Wladi, por tudo o que vivemos e ainda vamos viver juntos. Pelo amor, carinho, dedicação, paciência e amizade dia a dia. Sem o seu apoio seria muito difícil a realização deste trabalho.

A toda minha família pelo incentivo, amor e presença constante na minha vida. Em especial aos meus irmãos Léo e Danilo, minhas sobrinhas Maria Alice e Evinha, às minhas avós, Maria Luiza e Alice (*in memorian*), aos meus avôs, Aderito (*in memorian*) e José Moreira (*in memorian*) e a minha querida tia Edinha.

À minha primeira orientadora, professora Kêsia Xisto, pelos ensinamentos, carinho e apoio constante.

Aos meus amigos do Departamento de Microbiologia do CPqAM, do curso de Doutorado do Departamento de Genética da UFPE e do Departamento de Antibióticos/UFPE por toda a amizade, carinho e incentivo. Agradeço especialmente aos meus queridos amigos Christiane Mota, Gláucia Lima, Danielle Patrice, Rita Mendonça, Carlos Eduardo Menezes, Jefferson Santos, Danilo Mamed, Januana Teixeira, Cynthia Maria, Gabriel Lobo, Klécia Melo, Alan Twaddle e Edneide Xavier.

À Marcella Sampaio, Bruna Marçal, Carolina Galvão, Julianne Santos, Yuri Domingos, Kleberth Domingos, Thaysa Coutinho e Pedro Coutinho pelo apoio e presença constante na minha vida.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente participaram desta jornada, por todo o apoio e amizade, muito obrigada.

“A ciência não tem, em seus momentos, a eternidade da obra de arte. Pense-se no busto de Nefertite, na *Vitória da Samotrácia*, na *Última ceia*. A ciência está em processo permanente de reformulação. Se deixar de o fazer, é a morte... Nenhum conceito, uma vez concebido, tem garantia de permanência indefinida ou de imutabilidade. Métodos de verificação são inventados e usados, e o apego teimoso a noções favoritas é um traço denunciador de decadência individual, que infelizmente pode contagiar legiões de prosélitos.”

(Prof. Aluízio Bezerra Coutinho)

Resumo

Staphylococcus aureus metilicina-resistente (MRSA) e metilicina-sensível (MSSA) são importantes patógenos nas infecções adquiridas na comunidade e nos hospitais no Brasil e em todo o mundo, podendo causar diversas doenças pela produção de exotoxinas. No presente estudo, foi realizada uma caracterização molecular em 89 isolados clínicos de *S. aureus* oriundos de hospitais públicos da cidade do Recife/PE, para melhor compreender os fatores de patogenicidade, a dispersão e a diversidade desses isolados, assim como a sua relação com as infecções nosocomiais. Foi realizada a pesquisa de quatorze genes de enterotoxinas (SE's), genes das toxinas ETA-B (Síndrome da Pele Escaldada) e TSST-1 (Síndrome do Choque Tóxico) em 31 isolados MRSA e 58 MSSA, assim como análise do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*). A tipagem molecular foi realizada utilizando as seguintes técnicas: polimorfismo do gene *coa*, *spa*, ribotipagem-PCR, MLST e PFGE. Nas reações de PCR, o gene mais frequentemente observado foi *seg*, presente em 88/89 (99%) isolados, seguido por *sem* 81/89 (91%), *seo* 80/89 (90%), *sen* 78/89 (88%) e *sei* 74/89 (83%), todos integrantes do cluster gênico de enterotoxinas (*egc*). Foram observados 25 genótipos distintos quando comparamos a presença do cluster *egc* completo em 63 (71%) isolados com todas as exotoxinas analisadas. O gene *tst* foi encontrado em seis isolados (cinco MSSA e um MRSA) e o gene *eta* em apenas um isolado MSSA. Foram observados isolados relacionados a clones epidêmicos internacionais MRSA como o Clone Epidêmico Brasileiro (BEC) (61% dos isolados MRSA), Pediátrico (36%), Nova Iorque/Japão (3%), USA400 (10% dos isolados MSSA), clone Berlim (2%), Pediátrico (14%), Nova Iorque/Japão (2%) e Oceania Sudoeste do Pacífico (17%). A análise do MLST e do gene *spa* revelou novos tipos de sequências multilocus e novos tipos de gene *spa*. Entre os 58 isolados MSSA, 30 foram considerados oxacilina-susceptíveis, *mecA* positivos (OS-MRSA). No estudo, foi possível documentar uma dispersão dos isolados MRSA e MSSA (incluindo os OS-MRSA) nos ambientes hospitalares, revelando um sério problema de Saúde Pública para a região.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; clones epidêmicos; exotoxinas; genotipagem; patogenicidade.

Abstract

Staphylococcus aureus methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive (MSSA) are important pathogens in hospital- and community-acquired infections in Brazil and worldwide, causing several diseases by the production of exotoxins. In the present study we performed a molecular characterization of 89 *S. aureus* clinical isolates from public hospitals in Recife/PE, for better understand the pathogenicity factors, spread and diversity of the isolates, as well as its association with nosocomial infections. We investigated fourteen genes of enterotoxins (SEs), genes of toxins ETA-B (scalded skin syndrome) and TSST-1 (toxic shock syndrome) in 31 MRSA isolates and 58 MSSA. Additionally, we analyzed the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in the isolates. Molecular typing was performed using the following techniques: *coa* gene typing, *spa* typing, PCR-ribotyping, MLST and PFGE. In the PCR reactions, the most frequent gene observed was *seg* in 88/89 (99%) isolates, followed by *sem* 81/89 (91%), *seo* 80/89 (90%), *sen* 78/89 (88%) and *sei* 74/89 (83%), all members of the enterotoxin gene cluster (*egc*). Twenty five genotypes were observed when we compared the presence of the complete *egc* cluster in 63 (71%) isolates with all the exotoxins analyzed. The *tst* gene was observed in six isolates (five MSSA and one MRSA) and *eta* gene was observed in only one MSSA isolate. Isolates belonging to international MRSA clones were present: Brazilian epidemic clone (BEC) (61% of MRSA isolates), Pediatric (36%), New York/Japan (3%). Some MSSA isolates were related to MRSA clones: USA400-related (10% of MSSA isolates), Berlin clone (2%), Pediatric (14%), New York/Japan (2%) and Oceania Southwest Pacific (17%). MLST revealed new sequence types (ST's): ST2381, ST2382, and ST2383 and new *spa* types: 10548 and 10550. Among isolates phenotypically identified as MSSA, we identified 30 oxacillin-susceptible, *mecA*-positive *S. aureus* (OS-MRSA) isolates. We document clonal spread of MRSA and MSSA (including OS-MRSA) in hospital environment, revealing a serious public health problem for the region.

Key words: *Staphylococcus aureus*; epidemic clones; exotoxins; genotyping; pathogenicity.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Micrografia eletrônica de microrganismos pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> .	03
Figura 2. (A e B) Micrografias eletrônicas de <i>S. aureus</i> .	05
Figura 3. (A) Impetigo em infante, (B e C) Furúnculo estafilocócico, (D) Folliculite e (E) Carbúnculo estafilocócico.	07
Figura 4. Representação esquemática do cromossomo de <i>S. aureus</i> (N315), associado a elementos genéticos específicos da cepa Mu50.	09
Figura 5. Representação da ligação de um superantígeno estafilocócico a uma molécula de MHC de classe II e a um receptor de célula T.	13
Figura 6. Representação esquemática da estrutura do cluster <i>egc</i> em <i>S. aureus</i> , mostrando os genes <i>seo</i> , <i>sem</i> , <i>sei</i> , <i>pent1</i> , <i>pent2</i> , <i>sen</i> e <i>seg</i> .	15
Figura 7. Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada em recém-nascido.	18
Figura 8. Eritrodermia (rash empalidecedor) em paciente com Síndrome do Choque Tóxico.	19
Figura 9. Mecanismo de resistência de <i>S. aureus</i> à meticilina, através da produção de PBP2a, impedindo a ligação do antibiótico à bactéria.	23
Figura 10. Prevalência de HA-MRSA no mundo.	27
Figura 11. Distribuição de clones MRSA no Brasil e em outros países da América Latina e Caribe.	29
Figura 12. Esquema representativo da região da sequência repetitiva do gene da coagulase (<i>coa</i>).	32
Figura 13. Esquema representativo da região polimórfica espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S de um operon ribossomal, mostrando localização do pareamento dos <i>primers</i> 1 e 2.	33
Figura 14. Representação esquemática do SCCmec tipos I ao VIII.	36
Figura 15. Representação esquemática do gene <i>spa</i> , evidenciando a região polimórfica Xr constituída de um número variável de SSRs.	37
Figura 16. Representação esquemática da técnica de MLST, demonstrando a amplificação dos fragmentos dos genes <i>housekeeping</i> por PCR e sequenciamento para determinação do tipo de sequência (ST) dos isolados e agrupamentos destes em complexos clonais (CC).	41

Figura 17. Esquema representativo do método de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), evidenciando a preparação do DNA bacteriano com imobilização das células de <i>S. aureus</i> numa matriz de agarose (<i>plugs</i>), lise das células com a enzima de restrição adequada, eletroforese em gel de campo pulsado e análise dos perfis eletroforéticos.	43
Figura 18. Representação esquemática do gene <i>spa</i> , mostrando a localização do pareamento dos <i>primers</i> F (1095) e R (1517) em regiões bem conservadas e flangeadoras da região X.	53
Figura 19. (A e B) Interfaces do software Ridom StaphyType para análise dos cromatogramas e sequências geradas no sequenciamento da região X do gene <i>spa</i> .	54
Figura 20. (A) Interface do software Lasergene's SeqMan Pro package (version 10.0.1, DNASTAR) para análise dos cromatogramas e das sequências obtidas. (B) Interface do banco de dados públicos internacional MLST (http://saureus.mlst.net) para obtenção do perfil alélico e determinação do ST dos isolados.	56
Figura 21. (A e B) Interfaces do programa BioNumerics v. 6.5 (Applied-Maths).	59
Figura 22. (A e B) Géis representativos dos produtos de amplificação da PCR dos genes toxigênicos nos isolados de <i>S. aureus</i> .	60
Figura 23. Frequência dos genes <i>sea-see</i> , <i>seg-seo</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i> e <i>tst</i> nos isolados de <i>S. aureus</i> .	61
Figura 24. Sítios mais frequentes de isolamento de <i>S. aureus</i> nos pacientes e os genes das exotoxinas relacionados.	64
Figura 25. (A e B) Antibiógramas representativos com discos de oxacilina e cefoxitina para avaliar a susceptibilidade de <i>S. aureus</i> a metilicina.	69
Figura 26. (A, B e C) Géis dos produtos de amplificação da PCR dos genes do complexo <i>mec</i> , <i>ccr</i> e gene <i>mecA</i> para caracterização do SCC <i>mec</i> dos isolados MRSA SCC <i>mec</i> tipos II, III e IV respectivamente.	70
Figura 27. Gel do produto de amplificação da PCR do complexo <i>ccr3</i> nos isolados SCC <i>mec</i> III.	71
Figura 28. Gel dos produtos de amplificação da PCR correspondentes ao complexo <i>ccr</i> e gene <i>mecA</i> presentes nos isolados MSSA.	72
Figura 29. (A e B) Géis representativos dos produtos de PCR do gene <i>coa</i> dos isolados clínicos de <i>S. aureus</i> .	73
Figura 30. (A e B) Perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR dos isolados de <i>S. aureus</i> .	74

- Figura 31.** Perfis eletroforéticos representativos da região polimórfica X do gene *spa* dos isolados de *S. aureus*. 75
- Figura 32.** Perfis eletroforéticos representativos dos genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* (≈600pb) presentes nos isolados de *S. aureus*. 78
- Figura 33.** Dendrograma gerado pela análise do PFGE de 31 isolados MRSA e cepas de referência. 84
- Figura 34.** Dendrograma gerado pela análise do PFGE de 55 isolados MSSA (incluindo os OS-MRSA) e cepas de referência. 90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tipos de SCCmec e seus respectivos complexos <i>mec</i> e <i>ccr</i> associados à <i>S. aureus</i> . Fonte: IWG-SCC (2012).	35
Tabela 2. Genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica de MLST e seus respectivos produtos gênicos.	39
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes de <i>sea-see</i> , <i>seg-seo</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> e <i>etb</i> nos <i>S. aureus</i> estudados.	48
Tabela 4. Tipos de SCCmec investigados, seus respectivos complexos <i>mec</i> e <i>ccr</i> associados à <i>S. aureus</i> , tamanho do produto amplificado e controles positivos utilizados nas reações de PCR.	51
Tabela 5. Sequência de <i>primers</i> utilizados no método de MLST para os genes <i>housekeeping arcC</i> , <i>aroE</i> , <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>pta</i> , <i>tpi</i> , <i>yqiL</i> , evidenciando o tamanho dos fragmentos sequenciados.	55
Tabela 6. Associação dos isolados de <i>S. aureus</i> que comportaram o cluster <i>egc</i> completo com outros genes toxigênicos analisados.	62
Tabela 7. Genes das exotoxinas, evidenciando os genes que compõem o cluster <i>egc</i> , sítios de infecção e setor de isolamento dos <i>S. aureus</i> nos hospitais.	65
Tabela 8. Tipos de gene <i>spa</i> observados nos isolados de <i>S. aureus</i> , evidenciando os tipos mais frequentes e os tipos desconhecidos descritos no estudo.	77
Tabela 9. Tipos de sequência multilocus (ST's) observados nos isolados de <i>S. aureus</i> , evidenciando os tipos mais frequentes e os tipos desconhecidos descritos no estudo.	80
Tabela 10. Caracterização de <i>S. aureus</i> isolados de amostras clínicas	91

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
µg	Micrograma
ATCC	Coleção de Cultura Americana (American Type Culture Collection)
BC	Clone Berlim
BEC	Clone Epidêmico Brasileiro
BHI	Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)
BURP	Algoritmo baseado em padrões de repetição
BURST	Algoritmo baseado nos tipos de sequências relacionadas
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido na comunidade
CCs	Complexos clonais
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEF/OXA	Cefoxitina/Oxacilina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração mínima inibitória
<i>coa</i>	Gene da coagulase
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<i>egc</i>	Cluster gênico de enterotoxinas
ETs	Toxinas esfoliativas
FRI	Instituto de Pesquisa em Alimentos (Food Research Institute)
GC	Guanina e Citosina
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina adquirido em hospital
IgG	Imunoglobulina G
IS	Sequência de inserção
ITS	Região espaçadora intergênica
KCl	Cloreto de potássio
KDa	KiloDalton
Mb	Megabase
<i>mecA</i>	Gene de resistência à meticilina
<i>mecI</i>	Gene que codifica uma proteína repressora da transcrição de <i>mecA</i>
<i>mecR1</i>	Gene que codifica uma proteína indutora da transcrição de <i>mecA</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MGEs	Elementos genéticos móveis
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MLST	Tipagem de sequência multilocus
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
NT	Não-tipável

NY/J	Clone Nova Iorque/Japão
OS-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oxacilina susceptível, <i>mecA</i> -positivo
OSPC	Clone Oceania Sudoeste do Pacífico
pb	Pares de bases
PBP	Proteína de ligação à penicilina
PC	Clone pediátrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
PRP	Penicilina-penicilinase resistentes
PVL	Proteína Pantón Valentine Leucocidina
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
Sag	Superantígeno
SaPI	Ilha de patogenicidade de <i>S. aureus</i>
SCC <i>mec</i>	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
<i>spa</i>	Gene da proteína A estafilocócica
<i>spaCC</i>	Complexo clonal <i>spa</i>
SSRs	Pequenas sequências repetidas em tandem
ST	Tipo de sequência multilocus
t	Tipo de sequência da região polimórfica Xr do gene <i>spa</i>
Tn	Transposon
tRNA	RNA transportador
TSS	Síndrome do Choque Tóxico
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico tipo 1
<i>tst</i>	Gene da toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Luz ultravioleta
<i>vanA-C</i>	Genes de resistência à vancomicina A-C
Xc	Região do gene <i>spa</i> que codifica a região de fixação da proteína A à parede celular C-terminal da bactéria
Xr	Região polimórfica do gene <i>spa</i> constituída de um número variável de SSRs

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Ilustrações	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	vii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 O gênero <i>Staphylococcus</i>	3
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.3 O genoma do <i>S. aureus</i>	8
2.4 A patogenicidade de <i>S. aureus</i>	9
2.5 Exotoxinas estafilocócicas	11
2.5.1 Aspectos genéticos e doenças associadas às enterotoxinas	13
2.5.2 Síndrome estafilocócica da pele escaldada e síndrome do choque tóxico estafilocócico	17
2.6 Resistência de <i>S. aureus</i> a antimicrobianos	20
2.6.1 Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	22
2.6.2 Clones Epidêmicos de <i>S. aureus</i> metilina resistente adquirido nos hospitais (HA-MRSA) e nas comunidades (CA-MRSA)	24
2.7 Genotipagem de <i>S. aureus</i>	30
2.8 Polimorfismo do gene da coagulase em <i>S. aureus</i>	31
2.9 A técnica de Ribotipagem-PCR	32
2.10 Tipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	34
	ix

2.11 Tipagem molecular pelo polimorfismo do gene <i>spa</i>	36
2.12 Tipagem de sequência multilocus (MLST)	39
2.13 Análise dos macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	41
3. Objetivos	44
4. Material e Métodos	45
4.1. Isolados de <i>S. aureus</i> estudados	45
4.2. Extração do DNA genômico bacteriano	45
4.3 Pesquisa dos genes toxigênicos e cluster <i>egc</i> em <i>S. aureus</i>	47
4.4 Susceptibilidade à metilina e caracterização do SCCmec	49
4.5 Pesquisa do gene da coagulase (<i>coa</i>) em <i>S. aureus</i>	52
4.6 Ribotipagem-PCR	52
4.7 Tipagem molecular pelo polimorfismo do gene <i>spa</i>	52
4.8 MLST	55
5. Resultados	60
5.1 Pesquisa dos genes toxigênicos e cluster <i>egc</i> em <i>S. aureus</i>	60
5.2 Susceptibilidade de <i>S. aureus</i> à metilina e caracterização do SCCmec	69
5.3 Tipagem Molecular de <i>S. aureus</i>	73
6. Discussão	97
7. Conclusões	107
8. Referências Bibliográficas	109
9. Curriculum vitae (Lattes)	

1. Introdução

Staphylococcus aureus é a principal causa de infecções bacterianas no homem e é um dos principais patógenos em infecções sistêmicas de origem comunitária e hospitalar em todo o mundo. A severidade das infecções varia desde infecções de pele a necrose pulmonar fatal e septicemia.

S. aureus assume relevância para a saúde pública, pois pode produzir exotoxinas, sendo frequentemente envolvido em quadros de diarreia associada ou não ao uso de antibióticos, gastroenterites, colites e intoxicações alimentares, além de poder causar doenças mais graves como a Síndrome da Pele Escaldada e a Síndrome do Choque Tóxico (TSS).

Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos representam um desafio no tratamento de infecções e são decorrentes do aumento da utilização destes medicamentos no tratamento de doenças. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a, pelo menos, um dos antimicrobianos frequentemente utilizados no tratamento dos pacientes.

A aquisição do gene *mecA* pelo *S. aureus* pode conferir à bactéria resistência ao antibiótico meticilina e a todos os antibióticos β -lactâmicos utilizados na clínica médica. De acordo com o perfil de susceptibilidade à meticilina, os isolados podem ser denominados *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) ou *Staphylococcus aureus* meticilina sensíveis (MSSA). Embora os isolados MSSA sejam sensíveis à meticilina, são considerados importantes patógenos nas infecções, visto que causam doenças graves em pacientes debilitados e persistem no ambiente hospitalar.

Quando patógenos de múltiplos genótipos infectam um hospedeiro, eles competem entre si por nutrientes e na transmissão, portanto o genótipo que apresentar maior virulência poderá ser favorecido. Esta variabilidade tem contribuído para a emergência e sazonalidade de perfis epidemiológicos distintos, o que sugere a necessidade de identificar clones/subtipos antes de serem adotadas medidas específicas de controle.

O conhecimento da cadeia epidemiológica de qualquer enfermidade é um passo fundamental para que sejam aplicadas medidas ideais de profilaxia e controle de uma doença. Para identificação e comparação de isolados de *S. aureus* em estudos epidemiológicos, várias técnicas moleculares foram desenvolvidas e utilizadas com esta finalidade.

Diante da importância de *S. aureus* nas patologias humanas e da insuficiência de estudos e informações sobre esta bactéria na região Nordeste, nosso objetivo foi realizar uma caracterização molecular de *S. aureus* isolados de pacientes admitidos em hospitais públicos da cidade de Recife/PE para melhor compreender os fatores de patogenicidade, a dispersão e a diversidade desses isolados, assim como a sua relação com as infecções nosocomiais.

2. Revisão da Literatura

2.1 O gênero *Staphylococcus*

De acordo com National Center for Biotechnology Information (2013), o gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas e “*coccus*” = semente ou grão) pertence à família Staphylococcaceae. *Staphylococcus* spp. apresentam-se em forma de cocos gram-positivos, com 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, formando cachos devido à sua divisão ocorrer de maneira aleatória e em vários planos (Figura 1). São imóveis, não esporulados e suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro. As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie. Em meio de agar sangue, algumas cepas produzem β -hemólise (KONEMAN et al., 2001; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).



Figura 1. Micrografia eletrônica de microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Fonte: Science Photo Library (2012).

As bactérias pertencentes a este gênero são catalase e termonuclease positivas, assim como coagulase positivas ou negativas dependendo da espécie (KLOSS; LAMBE, 1991). *Staphylococcus* spp. são mesófilos, apresentando temperatura de crescimento entre 4°C e 46°C, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C, e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOFF, 2000). Apresentam capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO; LANDGRAFF, 2000).

O gênero *Staphylococcus* abrange cerca de 40 espécies diferentes (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2013) e, em patologias humanas, as principais espécies envolvidas são: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (TRABULSI et al., 2002; CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

2.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus (Figura 2) é um dos principais patógenos em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo, conseqüentemente, a espécie mais extensivamente estudada entre os *Staphylococcus* (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007). Este patógeno produz um pigmento carotenoide denominado de staphyloxanthin, que confere ao mesmo uma coloração amarelada ou dourada (do grego “*aureus*” = dourado) (SCHELIN et al., 2011; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; TONG; CHEN; FOWLER Jr, 2012). É uma bactéria imóvel, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa. É capaz de existir em ambientes inanimados (como cateteres e alimentos) e

sobreviver em compartimentos intracelulares (SCHELIN et al., 2011; STEFANI; GOGGIO, 2010).

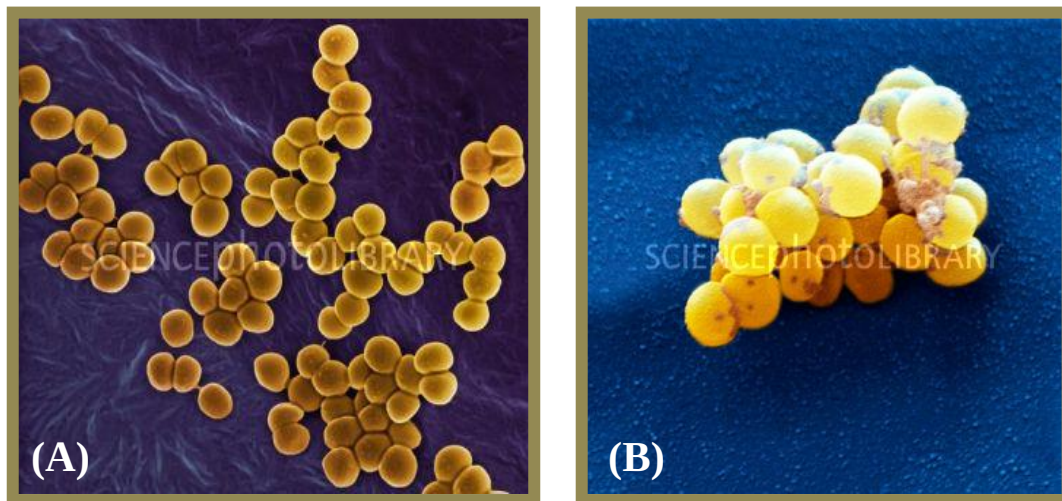


Figura 2. (A e B) Micrografias eletrônicas de *S. aureus*.

Fonte: Science Photo Library (2012).

S. aureus pode produzir hemolisinas, que são enzimas responsáveis pela lise das hemácias. São desoxirribonuclease (DNase) e nuclease termoestável positivos, novobiocina sensíveis e fermentam manitol (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; BERNARDO et al., 2005). *S. aureus* produz uma proteína extracelular, chamada coagulase (ou *staphylocoagulase*), a qual forma um complexo, de forma específica, com a protrombina (KAIDA et al., 1987), que pode degradar o fibrinogênio em fibrina formando um coágulo ao redor das células bacterianas e dificultando o acesso dos mecanismos de defesas do hospedeiro (SU et al., 1999; SCHAECHTER et al., 2002).

É encontrado no ambiente externo e em narinas anteriores de 20-40% dos adultos. Além disso, 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente por esta

bactéria (BANIA et al., 2006; DeLEO et al., 2010; TONG; CHEN; FOWLER Jr, 2012). Outros sítios de colonização incluem pregas cutâneas, períneo, axilas, vagina, garganta, intestino, pele humana e em mucosas, tais como bucal, nasal e auricular (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; BERNARDO et al., 2005).

A transmissão pode acontecer por contato direto ou indireto, o que possibilita a contaminação do paciente através dos profissionais de saúde, que dão assistência a outros hospitalizados portadores, ou no manuseio de objetos contaminados (ELLIOT et al., 2002; TAMMELIN et al., 2003).

É um patógeno oportunista, responsável por infecções de pele e tecidos moles (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007), podendo ocasionar foliculite, furunculose, carbunculose e impetigo, quando presente na pele (Figura 3) (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; BERNARDO et al., 2005).

A foliculite é a infecção do folículo piloso, que surge em decorrência de sua obstrução. O furúnculo, ou abscesso, é a infecção dos folículos pilosos ou glândulas sebáceas obstruídas, com envolvimento do tecido celular subcutâneo. Quando o furúnculo apresenta vários sítios de drenagem, recebe a designação de carbúnculo estafilocócico, particularmente quando localizado na nuca ou parte superior das costas. O impetigo é caracterizado como uma lesão cutânea localizada (MIMS et al., 1999; TRABULSI et al., 2002).

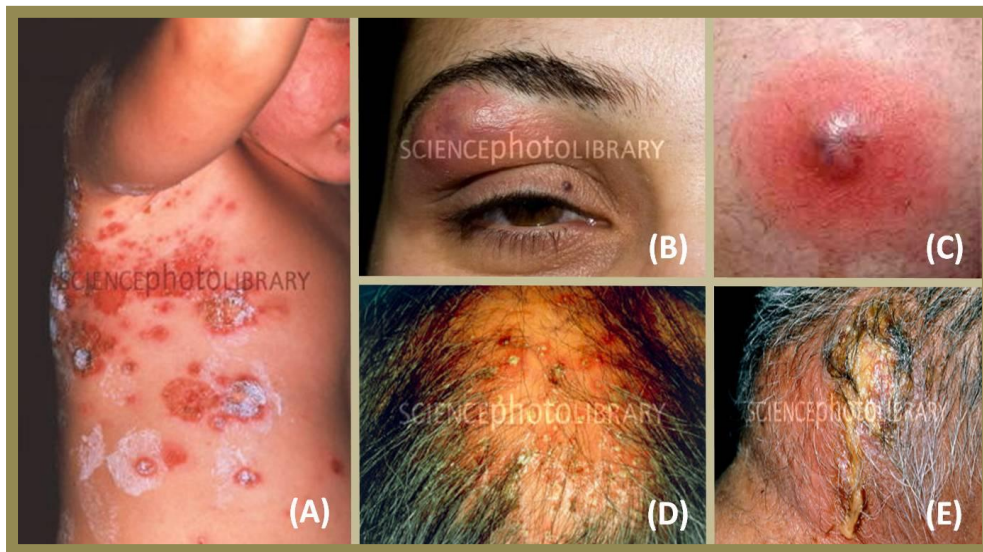


Figura 3. (A) Impetigo em infante, (B e C) Furúnculo estafilocócico, (D) Folliculite e (E) Carbúnculo estafilocócico.

Fonte: (A, B, D e E) Science Photo Library (2012); (C) Santos-Filho (2003).

S. aureus também pode ocasionar infecções sistêmicas graves como infecções de sítios cirúrgicos, osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia, meningite e artrite adquiridas ou não em hospitais. Um grande número de infecções já foi relatado por conta do desenvolvimento de procedimentos médicos, incluindo o uso de próteses, imunossupressores e cateteres (TRABULSI et al., 2002; SPICER, 2002; CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

S. aureus também pode causar doenças através da produção de toxinas, como a Síndrome do Choque Tóxico, Síndrome da Pele Escaldada, gastroenterite, enterocolite, diarreia e intoxicação alimentar pela ingestão de enterotoxinas (NOVICK; SCHLIEVERT; RUZIN et al., 2001; ORTEGA et al., 2010).

2.3 O genoma do *S. aureus*

O genoma de *S. aureus* foi sequenciado pela primeira vez em 2001 e, atualmente, existem mais de trinta sequências completas depositadas no banco de dados público GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (KURODA et al., 2001; STEFANI et al., 2012; NCBI et al., 2013).

O genoma de referência de *S. aureus* corresponde ao da cepa N315 (Figura 4), isolada em 1982 a partir de um esfregaço da faringe de um paciente no Japão. Este é composto por uma mistura complexa de genes e a maioria dos genes de resistência a antibióticos foram observados em plasmídeos e em elementos genéticos móveis. O genoma da cepa N315 possui cerca de 2.8 mega bases (Mb), 2.695 genes e baixo conteúdo de GC (32,8%) (KURODA et al., 2001; NCBI, 2013).

Os elementos genéticos móveis (MGEs) de DNA apresentam um papel crucial na plasticidade do genoma, permitindo que a bactéria se adapte rapidamente aos diversos ambientes. *S. aureus* é conhecido por adquirir resistência a antibióticos, onde alguns dos genes responsáveis pela resistência são codificados por MGEs e por conter também vários genes de virulência. *S. aureus* possui diversos tipos de MGEs como plasmídeos, transposons (Tn), ilhas de patogenicidade, sequências de inserção (IS) e cassetes cromossômicos estafilocócicos (ITO et al., 2003; FUDA, FISHER; MOBASHERY, 2005; MALACHOWA; DeLEO, 2010), o que permite a transferência horizontal desses determinantes de virulência, fornecendo ao patógeno diversos mecanismos capazes de causar doenças (XIE et al., 2011).

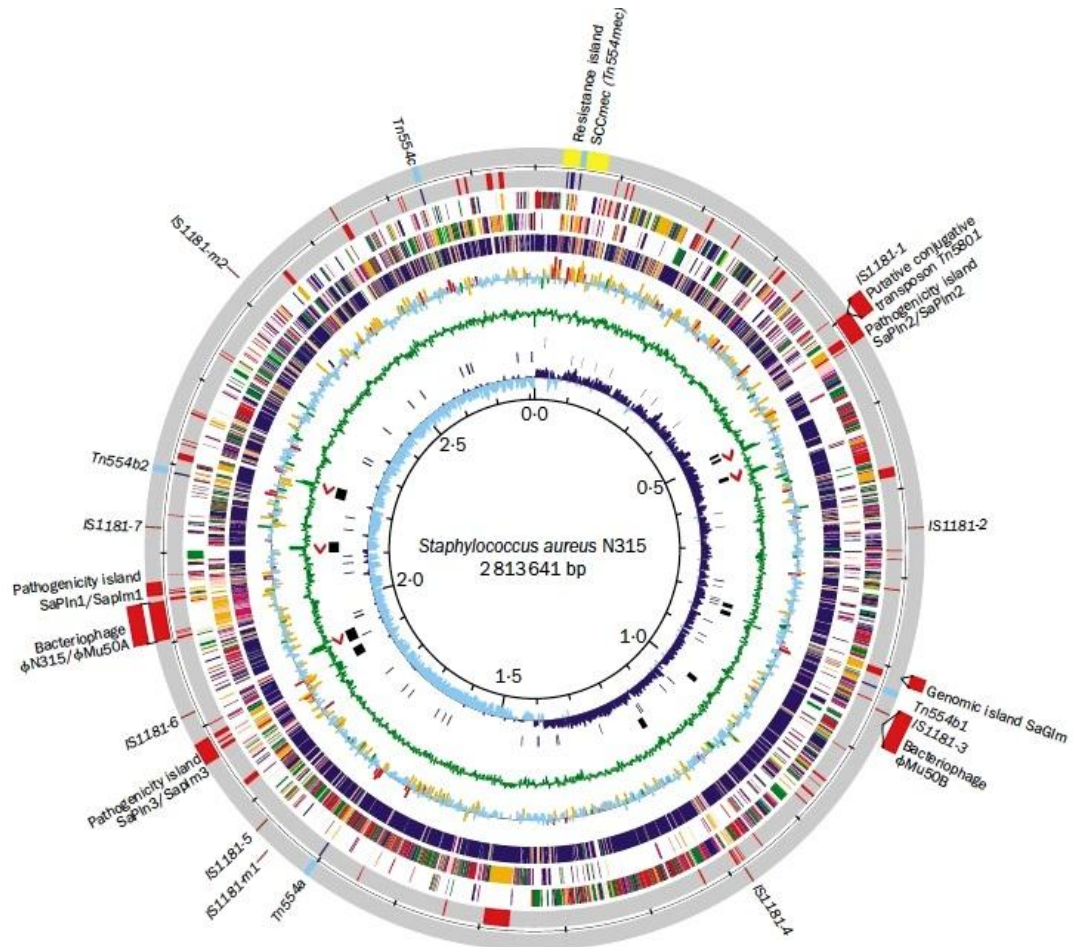


Figura 4. Representação esquemática do cromossomo de *S. aureus* (N315), associado a elementos genéticos específicos da cepa Mu50.

Fonte: Kuroda et al. (2001).

2.4 A patogenicidade de *S. aureus*

Para causar doença, o patógeno deve obter acesso ao hospedeiro, aderir aos tecidos do mesmo, penetrar ou evadir suas defesas e lesar seus tecidos. Contudo, alguns microrganismos não causam doença por lesar diretamente os tecidos do hospedeiro. Ao

invés disso, a doença ocorre devido à produção de toxinas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A capacidade dos microrganismos de produzir toxinas é denominada toxigenicidade. As diversas toxinas produzidas são substâncias de origem protéica classificadas em exo e endotoxinas, sendo as exotoxinas bacterianas as toxinas biológicas mais potentes que se conhece (KONEMAN et al., 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As exotoxinas são proteínas produzidas no interior de algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas, decorrentes da multiplicação e metabolismo dos microrganismos e são secretadas pela bactéria no meio circundante ou liberadas após a lise. Uma vez que as exotoxinas são solúveis nos líquidos corporais, elas podem se difundir facilmente no sangue e são rapidamente transportadas através do corpo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Classicamente as exotoxinas são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem na transmissão normal de impulsos nervosos; e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As endotoxinas correspondem à porção externa da parede celular das bactérias gram-negativas, que são liberadas após a morte bacteriana e lise da parede celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

S. aureus apresenta um extraordinário repertório de fatores de virulência que o permite sobreviver em condições extremas no hospedeiro humano. A patogenicidade de *S. aureus* é multifatorial e geralmente envolve um grande número de proteínas extracelulares, como a produção de citotoxinas, enterotoxinas e exoenzimas como

coagulase, hialuronidase e catalase (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002; GORDON; LOWY, 2008; LIU, 2009).

Algumas cepas produzem uma enorme variedade de toxinas extracelulares e fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade do microrganismo, garantindo o sucesso na sua instalação, desenvolvimento e manutenção no tecido hospedeiro (AKINEDEN et al., 2001; DEGO; VAN DIJK; NEDERBRAGT, 2002; PALMQVIST et al., 2002; STEVENS et al., 2007).

2.5 Exotoxinas estafilocócicas

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são as enterotoxinas (SEs), responsáveis por gastroenterite, enterocolite, diarreia, intoxicação alimentar estafilocócica e outras doenças no homem. As enterotoxinas estafilocócicas fazem parte de uma família de cerca de 20 exotoxinas diferentes, que são funcionalmente relacionadas e apresentam homologia nas sequências (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; LIN et al., 2010). As principais enterotoxinas estafilocócicas são identificadas como SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (CARMO et al., 2002), SEK (ORWIN et al., 2001), SEL (ORWIN et al., 2003), SEM, SEN, SEO (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003) e SEU (LETERTRE et al., 2003).

A toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) é uma exotoxina responsável pela Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico (BERGDOLL et al., 1981) e as Toxinas Esfoliativas dos tipos A (ETA) e B (ETB) (LEE et al., 1987) são as principais responsáveis pela Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada, (YAMAGUCHI et al., 2002).

As enterotoxinas são proteínas de cadeia simples e globulares com peso molecular que varia entre 22 e 29 kDa, são solúveis em água e em soluções salinas (MARTÍN et al., 2004; HENNEKINNE, DE BUYSER; DRAGACCI, 2011). Estas não são consideradas apenas potentes toxinas gastrointestinais, mas também são reconhecidas como superantígenos, assim como as toxinas esfoliativas e a TSST-1 (BAKER; ACHARYA, 2004; ORTEGA et al., 2010; XU; McCORMICK 2012).

O termo superantígeno (SAg) foi designado por John Kappler em 1989 para denotar um grupo particular de toxinas que apresenta a capacidade de estimular uma enorme quantidade de linfócitos T (WHITE et al., 1989; FRASER; PROFT et al., 2008). São produzidas por apenas alguns poucos patógenos, incluindo os *S. aureus* e cerca de 80% dos isolados clínicos comportam ao menos um gene que codifica um SAg, embora a maioria dos isolados comporte vários genes (XU; McCORMICK 2012).

Os SAg estimulam uma resposta policlonal inespecífica de células T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa, os quais prolongam a infecção bacteriana às custas da saúde do hospedeiro humano. Os superantígenos ligam-se simultaneamente às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e a receptores de células T, independentemente de suas especificidades de ligação a peptídeos, formando um complexo trimolecular, que induz a proliferação demasiada de células T, como demonstrado na figura 5 (PARHAM, 2001; BAKER; ACHARYA, 2004; XU; McCORMICK 2012). Os SAg também apresentam habilidade em atravessar a mucosa epitelial das células (HAMAD et al. 1997).

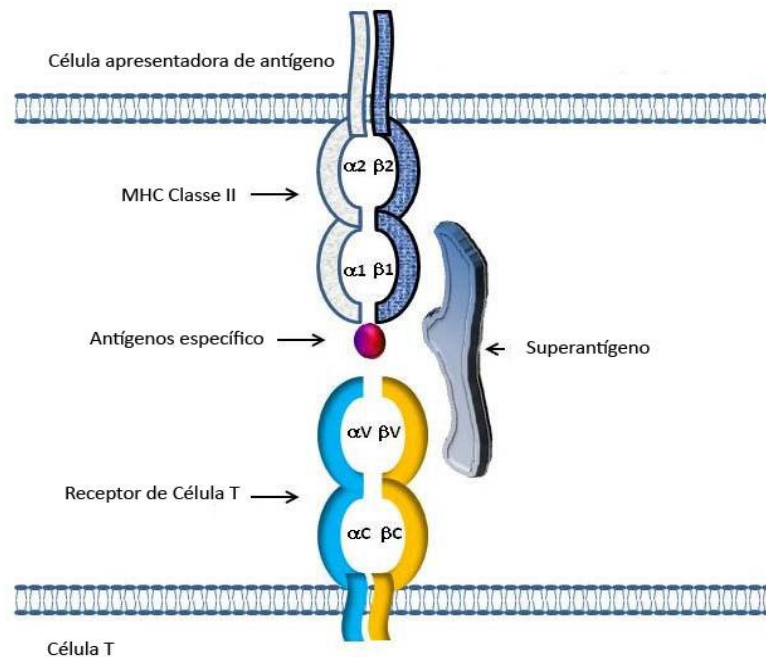


Figura 5. Representação da ligação de um superantígeno estafilocócico a uma molécula de MHC de classe II e a um receptor de célula T.

Fonte: Pinchuk, Beswick e Reyes (2010) com modificações.

2.5.1 Aspectos genéticos e doenças associadas às enterotoxinas

Os superantígenos são proteínas acessórias e, dessa forma, não são requeridas para o crescimento e multiplicação do microrganismo e geralmente são codificadas por elementos genéticos acessórios (NOVICK; SCHLIEVERT; RUZIN, 2001). Assim, diversos genes que codificam enterotoxinas são observados em plasmídios (genes *sed* e *sej* [plasmídio pIB485]) (BAYLES; IANDOLO, 1989; ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998), fagos (*sea* e *see*) (BETLEY; MEKALANOS, 1985) e ilhas de patogenicidade (SaPI) no cromossomo, como *seb* (SaPI3), *sec* (SaPI4), *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* (SaPI3), *sek*

(SaPI1, 3 e 4) e *seI* (SaPI 3 e 4) (NOVICK; SCHLIEVERT; RUZIN, 2001; LETERTRE et al., 2003; FRASER; PROFT et al., 2008).

Há uma variação de sequência gênica notável entre os membros da família dos superantígenos estafilocócicos. Os membros mais distantes, SEB e SEK, compartilham 15% de identidade entre os aminoácidos. Excluindo as variantes alélicas, os membros mais similares são SEA e SEE, que apresentam 90% de identidade entre os aminoácidos (FRASER; PROFT et al., 2008). A análise de genes SE indica uma divergência gênica a partir de um ancestral comum, porém até o momento não foi identificado este ancestral e assume-se que a transmissão horizontal dos genes toxigênicos associada à evolução vertical é a grande responsável pela diversidade das enterotoxinas (NOVICK; SCHLIEVERT; RUZIN, 2001).

Os genes das enterotoxinas SEG, SEI, SEM, SEN e SEO, coexistem em um elemento genético comum, um cluster gênico de enterotoxina (*egc*) de cerca de 6400 pb presente na SaPI3, com dois pseudogenes, ϕ ent1 e ϕ ent2 (ambos sem função biológica definida), localizados entre os genes *sei* e *sen* (Figura 6). A propriedade emética das enterotoxinas SEO, SEM e SEN é incerta, porém apresentam comprovada atividade superantigênica (JARRAUD et al., 2001; LETERTRE et al., 2003; COLLERY et al., 2009, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2013).

Já foram descritos quatro diferentes subtipos de cluster *egc* em *S. aureus*: (i) *egc1* (harborando *seo*, *sem*, *sei*, ϕ ent1, ϕ ent2, *sen* e *seg*), como representado pela cepa A900322 (Gen-Bank AF285760) (Figura 6), (ii) *egc2* (contendo *seu* originado pela junção de ϕ ent1 e ϕ ent2), representado pela cepa FRI137 (GenBank AY158703), (iii) *egc3* (contendo *seo*, *sem*, *sei*, *seu*, *sen* e *seg* variantes), cepa 382F (GenBank AY158703) e

(iv) *egc4* (contendo *seo*, *sev*, *seu*₂, *sen* e *seg*), como representado pela cepa A900624 (GenBank EF030427) (COLLERY et al., 2009).

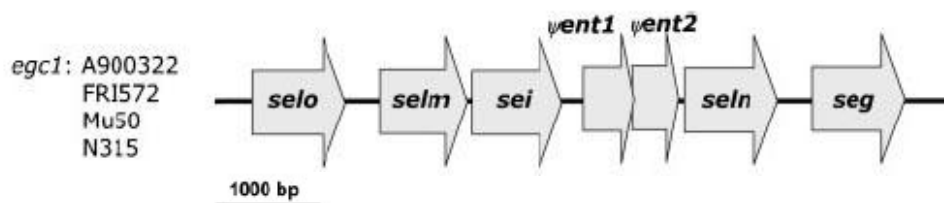


Figura 6. Representação esquemática da estrutura do cluster *egc* em *S. aureus*, mostrando os genes *seo*, *sem*, *sei*, ϕ ent1, ϕ ent2, *sen* e *seg*. (número de acesso no GenBank – A900322 [AF285760 corrigido por DQ993159]; FRI572 [AF156894]; Mu50 [BA000017]; N315 [BA000018])
Fonte: Collery et al. (2009).

Em pacientes hospitalizados, observam-se frequentemente casos de diarreia como consequência do tratamento com antibióticos, com severidade que varia de média a fatal. Embora não seja fácil determinar o agente causador, *S. aureus* enterotoxigênico já foi associado à diarreia associada ao uso de antibióticos, especialmente em enfermarias geriátricas e unidades de tratamento intensivo (UTI). Entretanto, *S. aureus* também apresenta capacidade de causar diarreia e enterocolite sem associação ao uso de antibióticos, principalmente em pacientes imunocomprometidos e indivíduos com condições predisponentes. É importante ressaltar que a maioria dos isolados resistentes à metilina são produtores de toxinas e a maior parte dos casos de diarreia associada ao uso de antibióticos é relacionada a isolados nosocomiais MRSA (SCHMITZ et al., 1997; BOYCE; HAVILL, 2005; PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010; LIN et al., 2010).

S. aureus é um dos agentes patogênicos mais comuns responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença

largamente distribuída na natureza, sendo transmitidos aos alimentos por manipuladores, portadores assintomáticos e pelos animais (BALABAN; RASOOLY, 2000; FREITAS et al., 2005; STAMFORD et al., 2006; SIMON; SANJEEV, 2006; XU, McCORMICK 2012).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação, tornando-se um risco para a saúde pública. Estima-se que de 100ng a 1µg são eficientes para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (BERGDOLL, 1990). As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência de intoxicação (MIMS et al., 1999; FREITAS et al., 2005; STAMFORD et al., 2006, ORTEGA et al., 2010).

A termoestabilidade e a relativamente alta resistência à proteólise das enterotoxinas, sugere que elas suportam tanto o tratamento térmico do alimento, quanto à digestão no estômago. As enterotoxinas podem ocasionar náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta, dor abdominal, desidratação decorrente da perda significativa de líquido, gastroenterite, sudorese e cefaleia, geralmente não acompanhada de estado febril (MURRAY et al., 1992; BANIA et al., 2006). Os sintomas variam de acordo com o grau de suscetibilidade, peso do indivíduo e concentração da enterotoxina no organismo (BAIRD-PARKER, 1990), sendo mais graves em crianças, idosos e pessoas acometidas por doenças crônicas imunossupressoras (CLIVER, 1994).

As enterotoxinas também já foram associadas com a Síndrome do Choque Tóxico, como SEA, SEC, SED (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002), SEB (RAJAGOPALAN et al., 2007), SEG, SEI (JARRAUD et al., 1999) e SEH (REN et al., 1994), a Síndrome da Pele Escaldada como SEA-SED, SEG e SEI (LINA et al., 1997) e à patogênese das

síndromes alérgicas crônicas (HU et al., 2011; VARSHNEY et al., 2009), assim como também já foram relacionadas à ulceração da córnea quando presentes em infecções oculares (FUJISHIMA et al., 2012). As enterotoxinas podem desempenhar um papel nas alergias associadas às vias respiratórias e à pele, como no caso das dermatites (BUNIKOWSKI et al., 2000, ORTEGA et al., 2010).

No Brasil, embora pequeno o número, foram realizadas pesquisas para verificar a presença de *S. aureus* enterotoxigênico no ambiente hospitalar e na comunidade. Os estudos demonstram variações em relação à presença de genes toxigênicos nos *S. aureus* isolados de alimentos, de portadores assintomáticos e de indivíduos com infecção estafilocócica (TORTORA et al., 1996; SOARES et al., 1997; SOUZA et al., 2009; DE MIRANDA et al., 2007; RALL et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011).

2.5.2 Síndrome estafilocócica da pele escaldada e síndrome do choque tóxico estafilocócico

A Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada, também conhecida como “doença de Ritter” ou necrose tóxica epidérmica em crianças (MIMS et al., 1999) foi descrita pela primeira vez por um médico alemão chamado Baron Gotfried Ritter von Rittershain, que observou casos da doença em crianças, porém não conseguiu determinar a causa da enfermidade na época (LADHANI et al., 1999). Na atualidade, sabe-se que a doença é causada por determinadas cepas de *S. aureus* produtoras principalmente das toxinas esfoliativas ETA e ETB. As duas toxinas são diferentes em termos bioquímicos e imunológicos, porém possuem atividades biológicas similares (KONEMAN et al., 2001).

Em pacientes acometidos pela doença, pode-se observar a formação de bolhas em amplas áreas corpóreas (lembrando o que ocorre quando a pele é banhada por água fervente), com posterior aparecimento de escaras nas camadas superficiais da pele, isso resulta em grandes áreas descamadas e em carne viva (Figura 7). A doença é usualmente observada em recém-nascidos e lactentes (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002), de 3 a 16 dias de idade (LADHANI et al., 1999) ou em crianças de até 5 anos de idade, com desenvolvimento incompleto de anticorpos contra toxinas estafilocócicas (BLYTH; ESTELA; YOUNG, 2007), embora adultos com infecções latentes também sejam susceptíveis (LADHANI et al., 2001).



Figura 7. Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada em recém-nascido.

Fonte: Tortora, Funke e Case (2005).

As toxinas esfoliativas apresentam os seguintes pesos moleculares: ETA 26,9 kDa, ETB 27,2 kDa (LEE et al., 1987; SATO et al., 1994). A atividade da ETA é estável, mesmo após aquecimento a 100°C por 20 minutos, o que não ocorre com ETB que é sensível ao aquecimento de 60°C por 15 a 30 minutos (SATO et al., 1994).

A Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico foi relatada pela primeira vez por Todd, Fishaut (1978). É uma doença caracterizada por ocasionar febre, vertigem ortostática, eritrodermia (rash empalidecedor), vômitos de intensidade variada, diarreia, cefaleia, calafrios, faringite, dor de garganta, conjuntivite (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; FRASER; PROFT, 2008) e descamação da pele, principalmente nas palmas das mãos e nas solas dos pés (TRABULSI et al., 2002; FRASER; PROFT, 2008) (Figura 8). A desordem rapidamente pode progredir e causar hipotensão, desconforto respiratório, insuficiência renal, coagulação intravenosa e choque (FRASER; PROFT, 2008).



Figura 8. Eritrodermia (rash empalidecedor) em paciente com Síndrome do Choque Tóxico.
Fonte: Hall (1991).

Inicialmente, a doença foi observada mais frequentemente em mulheres, em idade reprodutiva, geralmente no período menstrual. Os pesquisadores dos primeiros casos verificaram uma associação entre o início da enfermidade e a utilização de tampões menstruais hiperabsorventes. Posteriormente esta síndrome foi descrita em mulheres (em período não menstrual) e homens, em qualquer idade (REISS, 2000; KONEMAN et al.,

2001), como uma complicação de abscessos estafilocócicos, osteomielite, infecções de feridas cirúrgicas e pneumonia pós-influenza (KONEMAN et al., 2001).

Pacientes com TSS não menstrual apresentam maior taxa de uso anterior de antibióticos, são mais propensos a adquirir TSS por infecções nosocomiais e tendem a desenvolver características de rash empalidecedor mais cedo. Vários adultos apresentam um nível protetor de anticorpos contra toxina-1 da síndrome do choque tóxico, porém as pessoas carentes desses anticorpos, colonizadas ou infectadas por *S. aureus* portador do gene *tst*, podem desenvolver a doença (REISS, 2000).

A toxina-1 da síndrome do choque tóxico é reconhecida como a principal causa da TSS (JARRAUD et al., 1999; VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002; RAJAGOPALAN et al., 2007). É uma proteína de 22 kDa e é codificada pelo gene *tst*, observado na SaPI1, de 15 a 19 kb, presente no cromossomo de *S. aureus* (PARSONNET, 1998; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; RUZIN; LINDSAY; NOVICK, 2001).

2.6 Resistência de *S. aureus* a antimicrobianos

A mortalidade de pacientes por bacteremia devido à infecção por *S. aureus* na era pré-antibiótica excedia 80%. A introdução da penicilina, um antibiótico β -lactâmico, no início da década de 1940, melhorou drasticamente o prognóstico de pacientes com infecção estafilocócica (LOWY, 2003), porém a resistência a essa droga foi relatada pouco tempo depois. Em 1942, o primeiro isolado de *S. aureus* resistente à penicilina foi detectado em um hospital e pouco depois foi observada resistência ao antibiótico na comunidade (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

A resistência à penicilina ocorre devido a expressão do gene *blaZ*, responsável pela produção de uma enzima denominada β -lactamase, que hidrolisa o anel β -lactâmico do antibiótico (FUDA; FISHER; MOBASHERY, 2005; LOWY, 2003). Ao final da década de 60, mais de 80% dos isolados de *S. aureus* adquiridos nos hospitais e na comunidade eram resistentes à penicilina (LOWY, 2003).

Em 1959, iniciou-se o emprego do antibiótico meticilina, um β -lactâmico semi-sintético resistente à ação das β -lactamases. Contudo, já em 1960 surgiu o primeiro caso de MRSA em um hospital britânico, devido a expressão do gene *mecA* (OLIVEIRA; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2002; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). Desde então, *S. aureus* meticilina resistente tem se disseminado ao redor do mundo, não apenas em ambientes hospitalares, mas também na comunidade, em pacientes sem histórico prévio de hospitalização (GORDON; LOWY, 2008; MILLAR et al., 2007).

No Brasil, isolados MRSA foram responsáveis por 54% das infecções nosocomiais em 2006 e cerca de 70% dos isolados de *S. aureus* exibe resistência a amoxicilina, ampicilina e penicilina G, restringindo o uso desses antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas (TAVARES, 2000; MEJÍA et al., 2010).

As drogas de escolha para tratar infecções causadas por MRSA são vancomicina, teicoplanina, linezolida e daptomicina (BRASIL, 2012; GOULD et al., 2012). O tratamento com glicopeptídeos (como teicoplanina e, principalmente, vancomicina) tem sido considerado padrão ouro para o tratamento de MRSA (STEFANI; GOGLIO, 2010; REHM; TICE, 2010). Entretanto, já existem casos de resistência ou susceptibilidade reduzida de *S. aureus* a esses antimicrobianos em vários países (MAINARDI et al., 1995; REHM; TICE, 2010; GARCÍA et al., 2010; KELLEY et al., 2011).

No Brasil, já foi observada resistência à vancomicina, porém esta não é mediada pelos genes *vanA-C*. Alguns autores relacionam a resistência ao antibiótico ao espessamento de parede observado nas bactérias envolvidas nos estudos (OLIVEIRA et al., 2001; MELO et al., 2005; PALAZZO; ARAUJO; DARINI; 2005).

2.6.1 Cassete cromossômico estafilocócio *mec* (SCC*mec*)

Os antibióticos β -lactâmicos atuam sobre a parede celular bacteriana, ligando-se às proteínas de membrana denominadas de proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que são enzimas transpeptidases ancoradas na membrana citoplasmática, responsáveis pelas etapas finais das ligações cruzadas da estrutura da parede celular, impedindo a síntese de peptídeoglicanos (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010). O gene *mecA* confere ao *S. aureus* resistência à meticilina e aos antibióticos β -lactâmicos em geral, por expressar uma PBP alternativa de 78 kDa, com baixa afinidade a esses antimicrobianos (PBP2a) (Figura 9) (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; STEFANI et al., 2012).

A PBP2a é refratário à ação de todos os β -lactâmicos disponíveis e é capaz de assumir as funções das quatro PBPs típicas de *S. aureus* quando na presença do antibiótico β -lactâmico. A PBP2a sofre uma alteração conformacional substancial no decurso das suas interações com o β -lactâmico, permitindo realizar as ligações cruzadas da estrutura da parede celular bacteriana mesmo na presença do antibiótico (FUDA et al., 2004; GUIGNARD; ENTENZA; MOREILLON, 2005) (Figura 9).

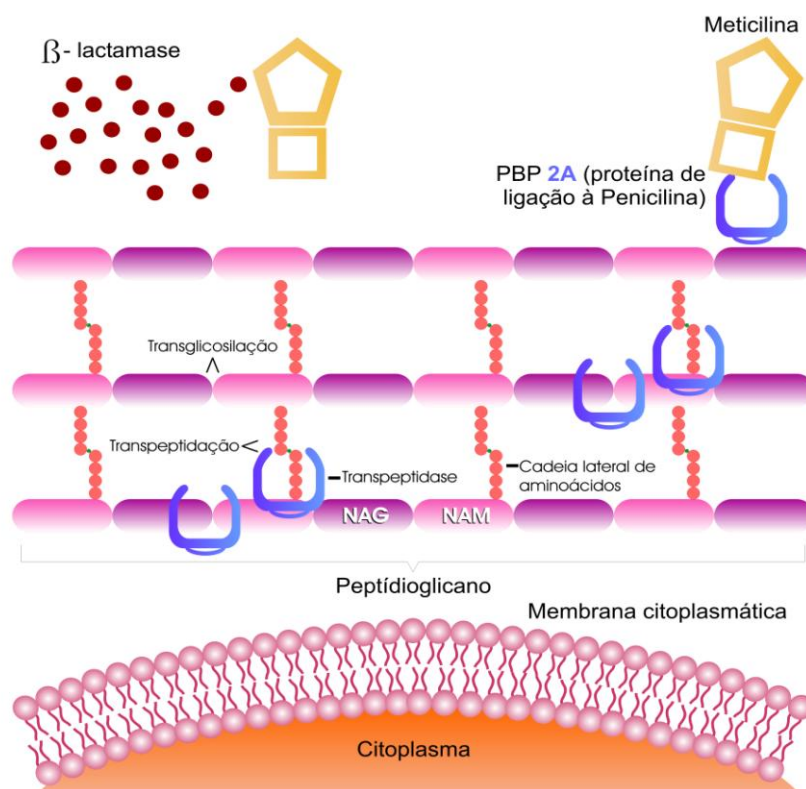


Figura 9. Mecanismo de resistência de *S. aureus* à meticilina, através da produção de PBP2a, impedindo a ligação do antibiótico à bactéria. NAG: N-acetil-glicosamina; NAM: N-acetil-murâmico.
Fonte: Autor.

O SCCmec é um grande fragmento de DNA e é considerado um elemento genético móvel do qual o gene *mecA* faz parte. O SCCmec se insere em um sítio específico (*attBsc*) na região 3' da *orfX* do genoma do *S. aureus* (MALACHOWA; DeLEO, 2010; TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011; SHORE et al., 2011). Especula-se que o SCCmec foi adquirido pelos *S. aureus* a partir dos *Staphylococcus sciuri* (WU et al., 1996; MALACHOWA; DeLEO, 2010).

O SCCmec pode ter um tamanho variável, dependendo de sua composição. O SCCmec é composto pelo complexo *mec*, o complexo *ccr*, regiões J (regiões de junção),

assim como outros fatores de resistência e de virulência que podem fazer parte do cassete cromossômico (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; MALACHOWA; DeLEO, 2010; TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011). Esses fatores, quando presentes, são integrados na região J do cassete (TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011).

O complexo *mec* é composto pela sequência de inserção (IS431), pelo gene *mecA* e seus genes reguladores *mecl* e *mecR1*. O *mecl* codifica uma proteína repressora da transcrição de *mecA*, enquanto o *mecR1* codifica uma proteína transmembrana sinalizadora de β -lactâmicos e indutora da transcrição do gene (PETINAKI et al., 2001). Na ausência do antibiótico, a proteína Mecl atua ligando-se à região promotora do gene *mecA*, impedindo a sua transcrição. Porém, quando a célula entra em contato com o β -lactâmico, a proteína MecR1 é clivada, a região citoplasmática da proteína se torna ativa e cliva o Mecl, permitindo a transcrição do *mecA* e expressão da PBP2a (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

O complexo *ccr* contém os genes *ccr*, que codificam recombinases da classe invertase/resolvase, cuja função é integrar ou excisar o SCC*mec* no genoma bacteriano (HANSEN; KJELDSEN; SOLLID, 2004; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

2.6.2 Clones Epidêmicos de *S. aureus* metilina resistente adquirido nos hospitais (HA-MRSA) e nas comunidades (CA-MRSA)

Os isolados MRSA responsáveis por infecções no ambiente hospitalar são denominados de HA-MRSA (*hospital-associated* MRSA), enquanto os isolados

associados à comunidade são denominados CA-MRSA (*community-associated* MRSA) (STEFANI et al., 2012).

Nos anos 80, os primeiros casos de infecção por MRSA na comunidade foram relatados em grupos populacionais específicos como usuários de droga intravenosa, residentes de instituições de saúde e pacientes com frequente contato com instituições de saúde. Embora estas infecções tenham ocorrido na comunidade, foram consideradas infecções associadas à assistência à saúde, devido à presença dos fatores de risco para aquisição de MRSA (SARAVOLATZ et al., 1982). Entretanto, no começo da década de 90, novas cepas MRSA foram isoladas de indivíduos aborígenes de comunidades remotas na Austrália, sem os tradicionais fatores de risco para aquisição de MRSA, sendo denominadas de CA-MRSA (UDO et al., 1993).

Epidemiologicamente, os CA-MRSA podem ser identificados de acordo com os critérios desenvolvidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), que são: diagnóstico de infecção por MRSA em paciente ambulatorial sem histórico de internação prévia ou submetido a procedimentos médicos invasivos durante o ano vigente, assim como isolamento de cultura positiva de MRSA em até 48 horas após a admissão do paciente no hospital sem histórico prévio de infecção ou colonização por MRSA (MILLAR et al., 2007).

O CA-MRSA pode ser caracterizado principalmente pela presença de SCCmec tipos IV, V, VII e pela presença da citotoxina Pantón Valentine Leucocidina (PVL), associada à necrose tecidual, especialmente pulmonar (STEFANI; GOGLIO, 2010; MILLAR et al., 2007; MARIMÓN et al., 2012).

Na atualidade, uma nova mudança no cenário epidemiológico do CA-MRSA tem sido observada com a migração destes patógenos para o ambiente hospitalar suplementando os tradicionais clones multirresistentes nosocomiais. Infecções por CA-MRSA têm sido frequentemente relatadas em pacientes hospitalizados, associadas a fatores de risco para infecções em instituições de saúde e sem relação aparente com a aquisição do patógeno na comunidade (KLEVENS et al., 2007; POPOVICH et al., 2008; MILLAR et al., 2007, DE MIRANDA et al., 2007). No Brasil, os primeiros casos de CA-MRSA associados a infecções hospitalares foram isolados de pacientes com bacteremia em hospitais do Rio Grande do Sul (RIBEIRO et al., 2005). Desde então, vários relatos têm documentado a disseminação de clones SCCmec tipo IV nos hospitais brasileiros (TRINDADE et al., 2005; VIDAL et al., 2009; DE MIRANDA et al., 2007).

Os isolados caracterizados como HA-MRSA podem causar infecções principalmente em idosos, bebês prematuros e pacientes imunocomprometidos presentes no ambiente hospitalar e podem se manifestar como complicações de procedimentos hospitalares, através do uso de equipamentos médicos, como cateteres, sondas e respiradores mecânicos resultando no aumento da morbidade, mortalidade e custos. Uma vez estabelecido no ambiente, o MRSA se dissemina rapidamente e com frequência se torna o clone predominante, responsável pela manutenção dos elevados índices de infecções hospitalares. (DAVIS et al., 2004; MILLAR et al., 2007; STEFANI; GOGLIO, 2010; STEFANI et al., 2012).

Caracteriza-se principalmente pela presença de SCCmec tipos I, II, III, VI e VIII, ausência de PVL na maioria dos casos, e pela pouca ou nenhuma susceptibilidade a outros agentes antimicrobianos. No Brasil a prevalência de HA-MRSA é de mais de 50%

em relação às infecções MRSA no ambiente hospitalar (Figura 10) (COSGROVE, 2006; MILLAR et al., 2007; STEFANI; GOGGIO, 2010; STEFANI et al., 2012).

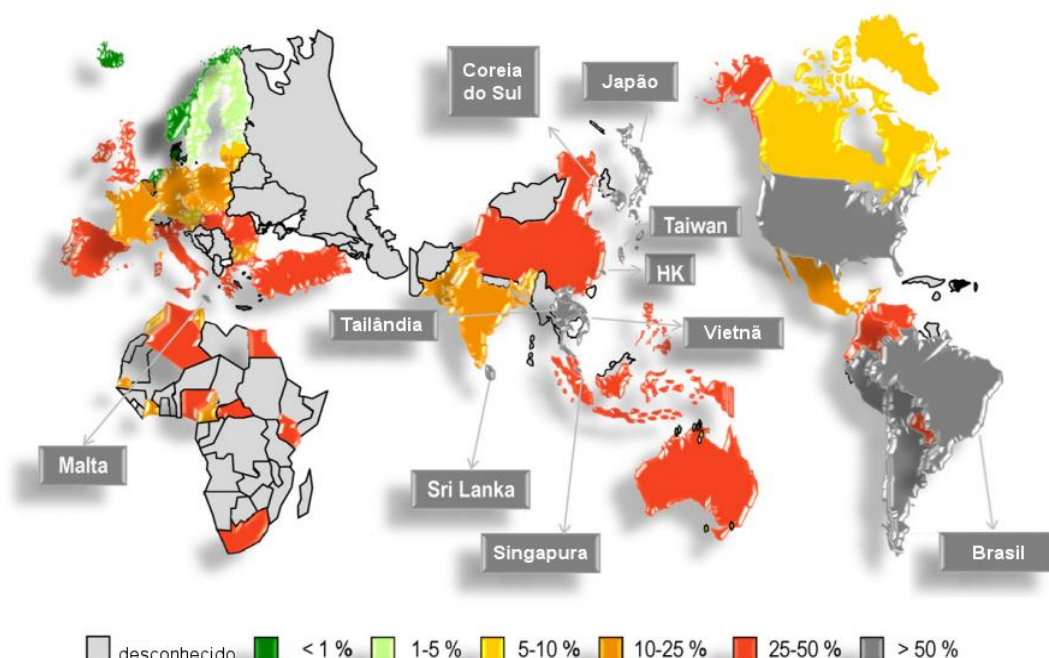


Figura 10. Prevalência de HA-MRSA no mundo. *HK, Hong Kong.

Fonte: Adaptado de Stefani et al. (2012).

A classificação de clones internacionais MRSA é baseada nas análises de tipagem de sequência multilocus (MLST), tipagem pelo polimorfismo do gene *spa*, tipagem do *SCCmec* e análise dos macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (ENRIGHT et al., 2000; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; STEFANI et al., 2012).

Os principais clones MRSA são: Clone Epidêmico Brasileiro (BEC), USA100 (clone Nova Iorque/Japão, NY/J, HA-MRSA), USA400 (CA-MRSA), USA500 (clone

Ibérico, HA-MRSA), USA600 (clone Berlim, BC, HA-MRSA), USA800 (clone Pediátrico, PC, CA- e HA-MRSA) e USA1100 (clone Oceania Sudoeste do Pacífico, OSPC, CA-MRSA) (McDOUGAL et al., 2003; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010).

No Brasil, existem cerca de 20 estudos que relatam os tipos de clones MRSA presentes no país. A publicação mais antiga descreve a disseminação inter-hospitalar de um único clone MRSA em oito dos nove hospitais sob vigilância epidemiológica em São Paulo entre 1990 e 1992 (SADER et al., 1994; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010). Um ano depois, isolados MRSA coletados de grandes hospitais universitários, presentes em diferentes regiões do Brasil, demonstraram o mesmo padrão de PFGE, indicando que um único clone epidêmico, o BEC, estava disseminado no Brasil (TEIXEIRA et al., 1995).

Desde então, o clone Brasileiro tem sido altamente prevalente nos hospitais do país, apresentando frequência acima de 50% em relação a todos os *S. aureus* isolados no Brasil (DE MIRANDA et al., 2007; PEREZ; D'AZEVEDO et al., 2008; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010). Este clone também está disseminado no ambiente hospitalar de vários países ao redor do mundo (RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010; GORDON; LOWY, 2008). O clone BEC e variantes relacionadas têm adquirido múltiplos genes de resistência a antibióticos diversos. Em adição a multirresistência, estes clones desenvolveram habilidade em produzir biofilmes e em várias cepas pode-se observar também a aquisição do gene que codifica a toxina PVL (AMARAL et al., 2005; VIVONE et al., 2006).

Embora o clone BEC MRSA esteja disseminado no Brasil, outros clones também se encontram em circulação no país (Figura 11) (DE MIRANDA et al., 2007; VIDAL et al., 2009; SILVA-CARVALHO et al., 2009; BELTRAME et al., 2012; SCHUENCK et al., 2012).

Na cidade do Rio de Janeiro, entre 1999 e 2000, o clone BEC coexistia com o clone pediátrico (USA800) (VIVONE et al., 2006; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010). Em 2004, um clone MRSA similar ao clone Nova Iorque/Japão (USA100) foi descrito na cidade do Rio de Janeiro (MELO et al., 2004).

Em 2002, isolados MRSA com sensibilidade a vários outros antimicrobianos foram identificados nas cidades de Recife e Rio de Janeiro. Os isolados foram responsáveis por severas infecções nosocomiais, exibiram padrões de PFGE similares ao clone pediátrico com habilidade de produzir biofilme e comportando genes toxigênicos (DE MIRANDA et al., 2007). Algumas cepas CA-MRSA têm sido identificadas principalmente no Rio de Janeiro e na cidade de Porto Alegre, sendo responsáveis por infecções tanto na comunidade, quanto nos hospitais (RIBEIRO et al., 2005; 2007).

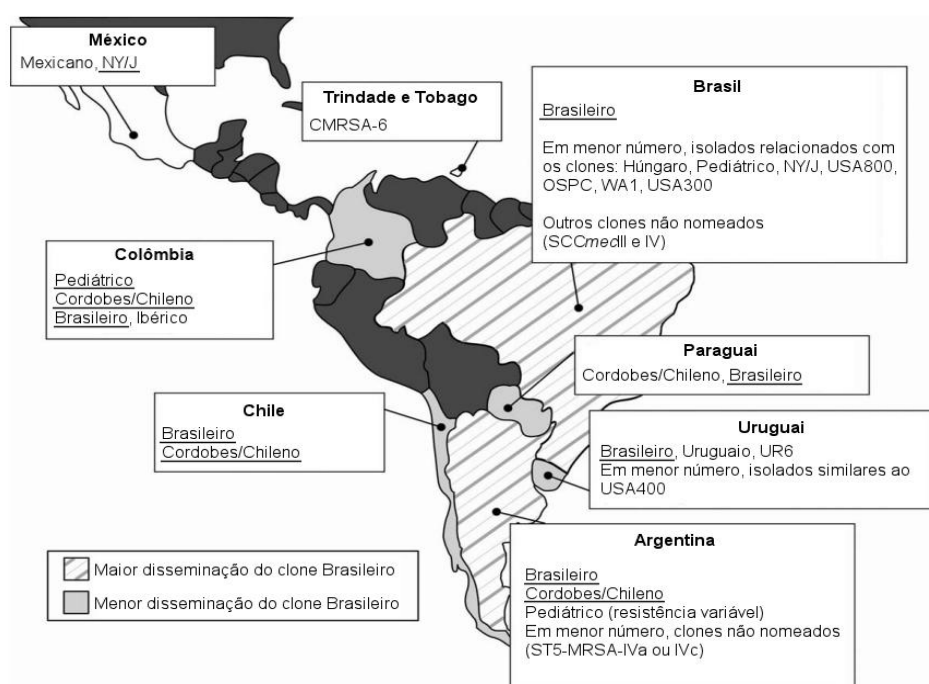


Figura 11. Distribuição de clones MRSA no Brasil e em outros países da América Latina e Caribe.

Fonte: Adaptado de Rodríguez-Noriega et al. (2010).

2.7 Genotipagem de *S. aureus*

De acordo com Tenover e colaboradores (1994), é importante definir, do ponto de vista epidemiológico, a origem dos organismos envolvidos na etiologia de uma doença. A adequada identificação do patógeno é um requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também para monitorar sua dispersão dentro e entre a população estudada.

As investigações epidemiológicas utilizam ferramentas moleculares que visam uma compreensão da variabilidade genética entre os isolados de *S. aureus*, a estrutura da população e como eles continuam a evoluir. Várias técnicas de tipagem molecular de *S. aureus* já foram desenvolvidas e apresentam um alto valor epidemiológico (STEFANI et al., 2012).

O conhecimento do perfil epidemiológico-molecular das doenças causadas por *S. aureus* poderá auxiliar na elaboração de estratégias de controle mais eficientes para a redução da infecção, uma vez que, a partir dos perfis moleculares, pode-se inferir relações genéticas entre os diferentes clones, monitorar os mesmos e traçar rotas de dispersão do patógeno (KAPUR et al., 1995; LANGE et al., 1999; SOMMERÄUSER et al., 2003; STEFANI et al., 2012). Uma considerável variabilidade do conteúdo genômico é observada em populações naturais de *S. aureus* (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010; STEFANI et al., 2012).

O desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares iniciaram uma revolução no diagnóstico, genotipagem e monitoramento de doenças infecciosas. Varias técnicas são úteis para a tipagem de amostras clínicas de *S. aureus*, tais como: associação

ribotipagem-PCR, análise de genes polimórficos como o gene da coagulase (*coa*) e da proteína A (*spa*), análise de genes de manutenção do genoma utilizando a técnica de MLST, tipagem do SCC*mec* e análise dos macrofragmentos de restrição separados por PFGE. Estas metodologias podem auxiliar no conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica das infecções causadas por *S. aureus* (TENOVER et al., 1994; AARESTRUP; DANGLE; SORDILLO, 1995; ENRIGHT et al., 2000; HARMSSEN et al., 2003; McDOUGAL et al., 2003; KONDO et al., 2007; STEFANI et al., 2012).

Adicionalmente, a utilização de mais de uma técnica para estabelecer relação entre isolados bacterianos se mostra muitas vezes necessária para aumentar a eficiência e o poder discriminatório das mesmas (TENOVER et al., 1994). Uma combinação de métodos de genotipagem é utilizada frequentemente para estudar a transmissão global de *S. aureus* nos hospitais e nas comunidades (SHOPSIN; KREISWIRTH, 2001; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010; STEFANI et al., 2012).

2.8 Polimorfismo do gene da coagulase em *S. aureus*

Existem numerosas formas alélicas da coagulase produzida por *S. aureus* e cada isolado pode produzir uma ou mais dessas variantes (GOH et al., 1992). Lawrence e colaboradores (1996), descreveram que o polimorfismo do gene *coa* é utilizado como marcador epidemiológico através de uma técnica de caracterização do *S. aureus*, que se baseia em um segmento variável dentro da região 3' codificante do gene (KAIDA et al., 1989; SHOPSIN et al., 2000).

Esta região variável, constituída de pequenas sequências repetidas em tandem (SSRs – *short sequence repeats*) de 81 pb, é utilizada em vários estudos epidemiológicos (Figura 12), pois permite subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de sequências repetitivas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas (GOH et al., 1992).

- SSRs do gene *coa* - *Staphylococcus aureus* (81pb)



GCTCGCCCGA CACAAAACAA GCCAAGCGAA ACAAATGCAT
ACAAACGTAAC AACACATGCA AATGGTCAAG TATCATATGG C

Figura 12. Esquema representativo da região da sequência repetitiva do gene da coagulase (*coa*).

Fonte: Shopsisin et al. (2000).

Alguns autores consideram a tipagem do gene *coa* uma ferramenta epidemiológica de significado simples e suficientemente reprodutível, específica e discriminatória quando empregada na subtipagem de *S. aureus* isolados de fontes humanas e animais (RAIMUNDO et al., 1999; SANTOS et al., 2003; SCHLEGELOVÁ et al., 2003).

2.9 A técnica de Ribotipagem-PCR

Os genes que codificam os rRNAs procarióticos são organizados em operons formados por três genes que codificam ordenadamente os rRNAs 16S, 23S e 5S separados por uma região espaçadora intergênica (ITS) entre cada gene, que contém um

ou mais genes de tRNA (Figura 13). Esta estrutura é similar em diversas espécies bacterianas (GRIMONT; GRIMONT, 1991).

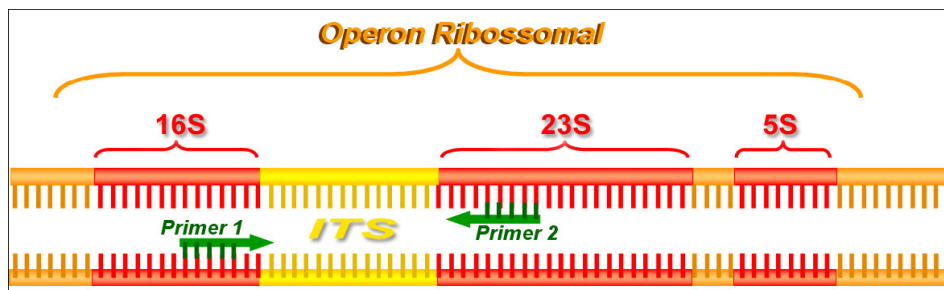


Figura 13. Esquema representativo da região polimórfica espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S de um operon ribossomal, mostrando localização do pareamento dos *primers* 1 e 2.

Fonte: Kostman et al. (1992).

As ITSs, que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem uma menor pressão evolutiva, logo apresentam uma maior variação genética que as regiões codificantes do rRNA, fornecendo uma informação taxonômica ainda mais valiosa (GRIMONT; GRIMONT, 1991). Pode-se observar de 10 a 12 operons ribossomais no genoma de *S. aureus* (GÜRTLER; BARRIE, 1995; FOGEL et al., 1999).

A análise do polimorfismo dos fragmentos da região intergênica 16S-23S amplificados por PCR foi empregado pela primeira vez como ferramenta de genotipagem entre isolados de *Pseudomonas cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp (KOSTMAN et al., 1992; 1995). Desde então, este método de tipagem, denominado Ribotipagem-PCR, foi empregado para identificar e relacionar clones e linhagens clonais estafilocócicas de origem humana e animal, gerando padrões cepa-específicos, revelando-se uma técnica simples, reprodutível e de fácil

interpretação (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993; BEZANSON; MACDONALD; DREBOT, 1995; BES et al., 2002; OLIVEIRA; RAMOS, 2002; SHITTU et al., 2006).

2.10 Tipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Os tipos de SCC*mec* são definidos a partir da combinação dos tipos de complexos gênicos, *mec* e *ccr*, presentes no cassete cromossômico de *S. aureus* (CHAMBERS; DeLEO, 2009).

Foram descritos na literatura cinco tipos de complexo *mec* em *S. aureus* de acordo com as diferentes combinações entre os dois genes regulatórios *mecI* e *mecR1* e sequências de inserção presentes em *S. aureus* (tipos A, B, C1, C2 e E) (Tabela 1) (FUDA; FISHER; MOBASHERY, 2005; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011). São conhecidos sete tipos de complexo *ccr* em *S. aureus* que se diferenciam pela combinação dos alotipos de genes *ccr* (TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011; IWG-SCC, 2012) (Tabela 1). O complexo *mec* tipo D e o complexo *ccr6* (A5B3) são observados em *S. caprae* e *S. pseudointermedius*, respectivamente, e por isso não estão representados na tabela 1 (KATAYAMA et al., 2001; IWG-SCC, 2009).

Existem onze tipos de SCC*mec* descritos até o momento (SHORE et al., 2011; TURLEJ; HRYNIEWICZ; EMPEL, 2011) e os mais comuns são os tipos: I (34,3 kpb), que comporta o complexo *mec* classe B e *ccr* 1; tipo II (53,0 kpb) complexo *mec* classe A e *ccr* 2; tipo III (35,2 kpb) complexo *mec* classe A e *ccr* 3; e tipo IV (24,0 kpb) complexo *mec* classe B e *ccr* 2 (Tabela 1 e Figura 14) (OLIVEIRA; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2002; MALACHOWA; DeLEO, 2010).

Tabela 1. Tipos de SCCmec e seus respectivos complexos *mec* e *ccr* associados à *S. aureus*.

Fonte: IWG-SCC (2012).

Tipo de SCCmec	Complexo <i>mec</i>	Complexo <i>ccr</i>
I	B* IS1272:IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	1 (A1B1)
II	A IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	2 (A2B2)
III	A IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	3 (A3B3)
IV	B* IS1272:IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	2 (A2B2)
V	C2** IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	5 (C)
VI	B* IS1272:IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	4 (A4B4)
VII	C1*** IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	5 (C)
VIII	A IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	4 (A4B4)
IX	C2** IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	1 (A1B1)
X	C1*** IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	7 (A1B6)
XI	E**** <i>blaZ</i> - <i>mecA</i> _{LGA251} - <i>mecR1</i> _{LGA251} - <i>mecI</i> _{LGA251}	8 (A1B3)

IS: sequência de inserção;

B* Δ *mecR1*-IS1272: *mecR1* truncado pela sequência de inserção 1272;C2** Δ *mecR1*-IS431: *mecR1* truncado pela sequência de inserção 431; IS431s dispostas em direções opostas;C1*** Δ *mecR1*-IS431: *mecR1* truncado pela sequência de inserção 431; IS431s dispostas na mesma direção;E**** *blaZ*-*mecA*_{LGA251}-*mecR1*_{LGA251}-*mecI*_{LGA251}: gene *blaZ* inserido no complexo *mec* e genes *mecA*-*mecR1*-*mecI* altamente divergentes dos genes presentes nos outros tipos de SCCmec, observados na cepa LGA251 oriunda de bovino.

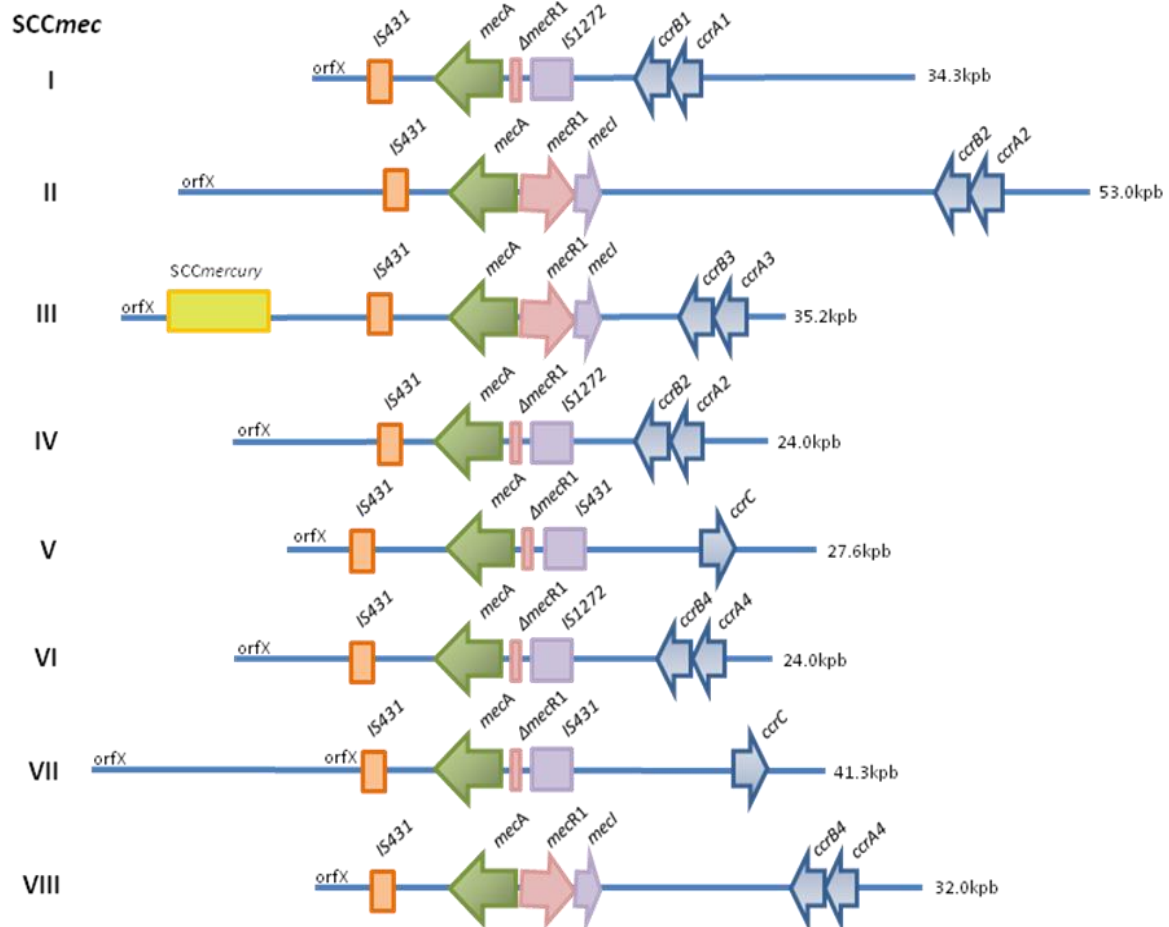


Figura 14. Representação esquemática do SCCmec tipos I ao VIII.

Fonte: Autor.

2.11 Tipagem molecular pelo polimorfismo do gene *spa*

Uma das principais proteínas de superfície de *S. aureus* é a proteína A estafilocócica (Spa), que compreende cerca de 7% da parede celular da bactéria. Spa se liga a porção Fc, fragmento correspondente a haste, da imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro. Esta porção normalmente se liga aos receptores de Fc dos fagócitos e, desta

forma, a bactéria torna-se revestida por uma camada protetora de anticorpos que evitam a opsonização e fagocitose da mesma (DOSSETT et al., 1969; GAO; STEWART, 2004).

Atualmente, o sequenciamento de DNA da região polimórfica X, ou região de pequenas sequências repetidas, SSRs, do gene da proteína A (*spa*), presente em todas as cepas de *S. aureus*, tem sido proposto como uma alternativa às técnicas atuais para a tipagem de *S. aureus* (VAN BELKUM et al., 1998) (Figura 15).

A região X do gene *spa* é constituída de um número variável de SSRs de 24pb, ladeado por regiões bem conservadas (SHOPSIN et al., 1999; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008) (Figura 15). O tipo de gene *spa* (t) em cada isolado de *S. aureus* é definido, portanto, de acordo com o número e o tipo de SSR (*repeats*) presente na região. Este método permite estudar a evolução molecular da bactéria, assim como surtos nos hospitais causados por isolados MRSA (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008) .

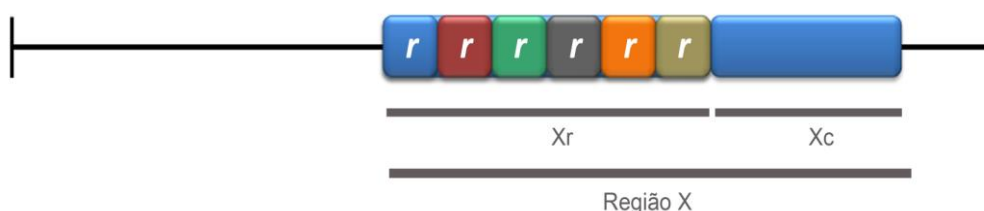


Figura 15. Representação esquemática do gene *spa*, evidenciando a região polimórfica Xr constituída de um número variável de SSRs. (r) sequências repetidas de 24pb; (Xc) sequência que codifica a região de fixação da proteína A à parede celular C-terminal da bactéria.

Fonte: Autor

Este método de tipagem baseado no sequenciamento de um único loco, desenvolvido por Frenay et al. em 1996, combina uma série de vantagens técnicas, tais como rapidez, menor custo e reprodutibilidade, comparado-se à técnica de MLST. Como mencionado por Tenover e colaboradores (1994), nenhum método de tipagem isoladamente parece ser claramente superior em todos os casos. No entanto, a capacidade do método em distinguir isolados de forma fácil e rápida, o torna particularmente adequado para uma triagem inicial que pode ser utilizada para identificar e direcionar estudos epidemiológicos (SHOPSIN et al., 1999; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

Outra vantagem da tipagem do gene *spa* é a disponibilidade do software Ridom StaphyType (Ridom GmbH, Würzburg, Alemanha) que é utilizado em laboratórios locais e de referência no mundo inteiro para analisar os cromatogramas gerados nos sequenciamentos. A nomenclatura universal utilizada para denominar os tipos de gene *spa* e o acesso público aos dados gerados pela tipagem do gene *spa* estão disponíveis na página da web da iniciativa SeqNet.org (<http://www.seqnet.org/>), que abriga o servidor central *spa* (<http://spaserver.ridom.de/>) no qual os dados são sincronizados (FRIEDRICH et al., 2006, DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

Os dados gerados pela tipagem do gene *spa* podem ser agupados em clusters, gerando complexos clonais *spa* (*spaCC*). Isto se tornou possível mediante a implementação de algoritmos baseados em padrões de repetição (BURP, *based upon repeat pattern*) no software Ridom StaphyType. A análise BURP permite determinar as relações clonais entre os isolados com base no tipo de gene *spa* presente nos mesmos (MELLMANN et al., 2007; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

2.12 Tipagem de sequência multilocus (MLST)

O método de tipagem, denominado tipagem de sequência multilocus, do inglês *Multilocus Sequence Typing* (MLST), é um método bastante discriminatório de genotipagem molecular, epidemiologicamente usada para o rastreamento de surtos de infecções, reconhecimento de clones hipervirulentos, estabelecimento da relação clonal entre as amostras e monitoramento através de programas de controle e erradicação das doenças (OLIVE; BEAN, 1999). Os dados das sequências são facilmente comparados entre laboratórios através da Internet (ENRIGHT et al., 2000; BOUGNOUX et al., 2004).

O MLST se baseia na análise por sequenciamento da sequência de nucleotídeos de sete fragmentos internos de genes polimórficos constitutivos (genes *housekeeping*) (Tabela 2) de aproximadamente 450 pares de bases (MAIDEN et al., 1998; SPRATT, 1999; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

Tabela 2. Genes *housekeeping* utilizados na técnica de MLST e seus respectivos produtos gênicos.

Genes <i>housekeeping</i>	Produto gênico codificado pelos genes
<i>arcC</i>	Carbamato quinase
<i>aroE</i>	Chiquimato desidrogenase
<i>glpF</i>	Glicerol quinase
<i>gmk</i>	Guanilato quinase
<i>pta</i>	Fosfato acetil transferase
<i>tpi</i>	Triosefosfato isomerase
<i>yqiL</i>	Acetil coenzima A acetil transferase

As diferentes sequências de cada fragmento gênico são consideradas como alelos distintos, e cada isolado é definido pelos alelos de cada um dos sete genes *housekeeping*, sendo atribuído ao isolado um perfil alélico ou tipo de sequência (ST). Por exemplo, o clone BEC tem o perfil de MLST (*arcC*) 2, (*aroE*) 3, (*glpF*) 1, (*gmk*) 1, (*pta*) 4, (*tpi*) 4, (*yqiL*) 3 e é definido como ST239, já o clone pediátrico tem o perfil de MLST 1, 4, 1, 4, 12, 1, 10 e é definido como ST5. Como existem muitos alelos de cada um dos sete locos, é altamente improvável que os isolados tenham perfis alélicos idênticos por acaso, e isolados com o mesmo perfil alélico, caso ocorra, podem ser designados como membros do mesmo clone (MAIDEN et al., 1998; SPRATT, 1999; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008) (Figura 16).

Para estudos epidemiológicos, linhagens de MRSA são distribuídas em complexos clonais (CCs), definidos por um algoritmo baseado nos tipos de sequências relacionadas (BURST, *based upon related sequence* [<http://www.eburst.mlst.net>]) de acordo com o perfil alélico das cepas determinado pela técnica de MLST (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; TENOVER; GOERING, 2009; MEHNDIRATTA; BHALLA, 2012; STEFANI et al., 2012) (Figura 16).. A grande maioria das infecções causadas por HA-MRSA são relacionadas a clones disseminados internacionalmente que fazem parte dos complexos clonais CC5 (ST5), CC8 (ST's 8, 239, 247, 250), CC22 (ST22), CC30 (ST30) e CC45 (ST45) (RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010).

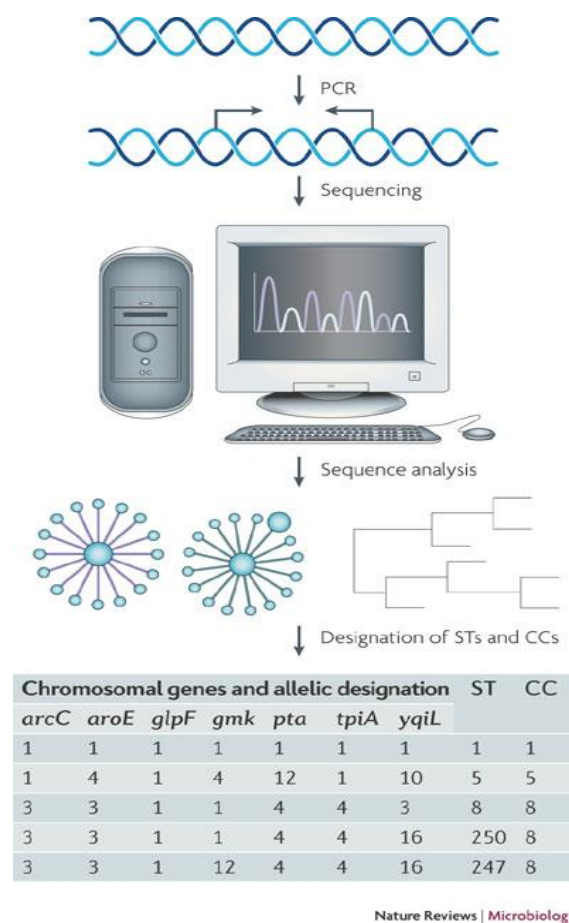


Figura 16. Representação esquemática da técnica de MLST, demonstrando a amplificação dos fragmentos dos genes *housekeeping* por PCR e sequenciamento para determinação do tipo de sequência (ST) dos isolados e agrupamentos destes em complexos clonais (CC).

Fonte: Chambers e DeLeo (2009).

2.13 Análise dos macrofragmentos de restrição separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A análise do polimorfismo dos macrofragmentos de restrição separados por PFGE é uma das técnicas de tipagem mais discriminatórias para tipagem de *S. aureus*. É a

técnica padrão utilizada no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos e tem sido utilizada com sucesso na investigação de surtos causados por MRSA nos hospitais, assim como no estudo da transmissão inter-hospitalar deste patógeno (TENOVER et al. 1995; ROBERTS et al. 1998; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

O método de PFGE se baseia na separação de fragmentos de DNA obtidos por digestão do cromossomo da bactéria com endonucleases de restrição, que cortam o DNA em grandes fragmentos (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992). A eletroforese em gel de campo pulsado força as moléculas de DNA a mudarem continuamente de direção, através de campos elétricos alternados (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992).

A preparação do DNA bacteriano para a aplicação da técnica de PFGE envolve a imobilização das células de *S. aureus* numa matriz de agarose (*plugs*), de modo a evitar quebras não específicas do DNA devido à agitação mecânica utilizada. A lise das células, a extração e a purificação do DNA são realizadas com as células oclusas na matriz de agarose. Posteriormente, realiza-se a incubação dos *plugs* com a enzima de restrição adequada para o DNA do patógeno. Após a incubação com a enzima de restrição, procede-se a etapa da eletroforese em gel de campo pulsado e análise dos perfis eletroforéticos (DEN DUNNEN; VAN OMMEN, 1992) (Figura 17).

Os critérios interpretativos mais utilizados dos perfis eletroforéticos gerados pelo PFGE são os descritos por Tenover e colaboradores (1995), onde perfis eletroforéticos indistinguíveis indicam a mesma origem clonal, perfis eletroforéticos com dois ou três fragmentos distintos indicam isolados estreitamente relacionados, perfis eletroforéticos com quatro a seis fragmentos distintos indicam isolados possivelmente relacionados e

perfis eletroforéticos com sete ou mais fragmentos distintos indicam que os isolados não são relacionados.

O método do PFGE apresenta limitações que resultam do fato de ser uma técnica que exige experiência na sua aplicação, é dispendiosa e extensa, exige o uso de um equipamento específico para eletroforese de campo pulsado e enzimas de restrição que são aplicadas em elevada concentração (BARROS, 2007).

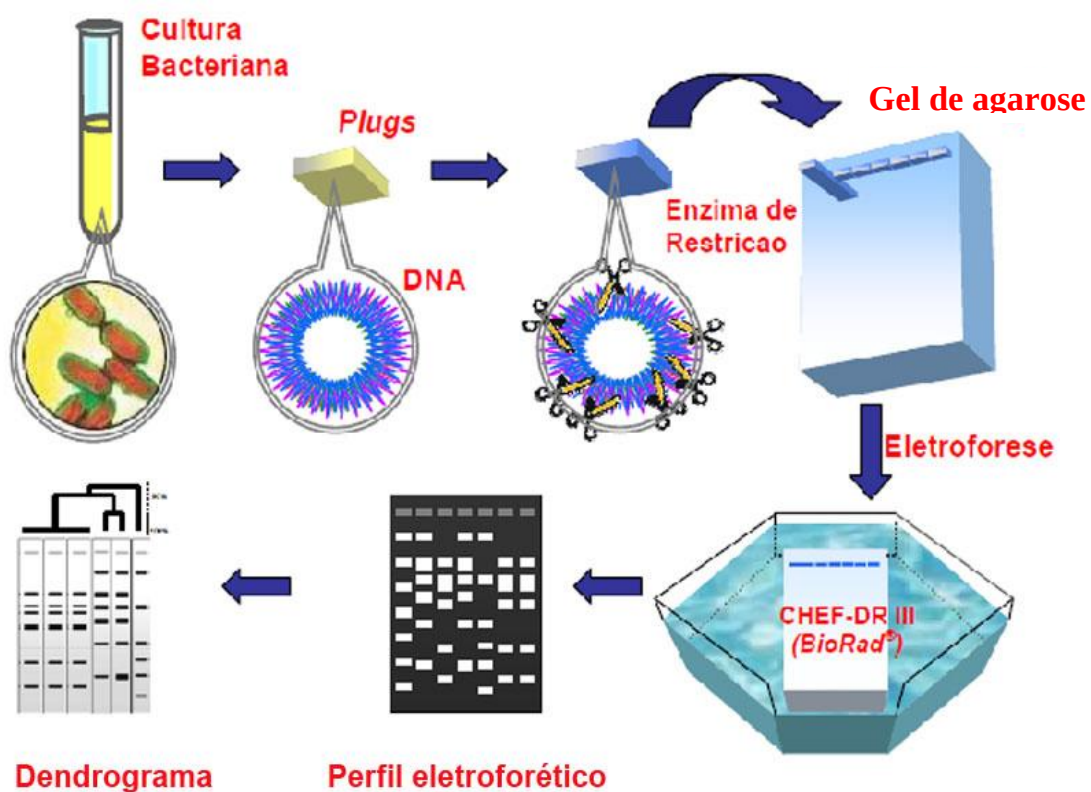


Figura 17. Esquema representativo do método de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), evidenciando a preparação do DNA bacteriano com imobilização das células de *S. aureus* numa matriz de agarose (*plugs*), lise das células com a enzima de restrição adequada, eletroforese em gel de campo pulsado e análise dos perfis eletroforéticos.

Fonte: Barros (2007).

3. Objetivos

3.1 Geral

Realizar uma caracterização molecular de *S. aureus* isolados de pacientes admitidos em hospitais públicos da cidade de Recife/PE para melhor compreender a dispersão e a diversidade desses isolados no ambiente hospitalar e sua relação com as infecções nosocomiais.

3.2 Específicos

1. Pesquisar a presença dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas clássicas (SEs) dos tipos A, B, C, D, E, H, J, K, L; além dos genes das enterotoxinas SEG, SEI, SEM, SEN e SEO (presentes no cluster *egc*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico TSST-1 e toxinas esfoliativas ETA e ETB em *S. aureus* isolados de diferentes sítios de infecção e setores de hospitais públicos da cidade do Recife-PE;
2. Caracterizar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos *S. aureus* à meticilina e caracterizar o SCCmec nos isolados;
3. Realizar tipagem molecular para caracterizar e verificar a distribuição dos isolados de *S. aureus* nos diferentes setores dos hospitais e possível distribuição inter e intra-hospitalar desses isolados, bem como definir as relações genéticas entre eles;
4. Correlacionar os perfis genotípicos, de susceptibilidade a meticilina, sítios de infecção e distribuição dos *S. aureus* em pacientes presentes nos diferentes setores dos hospitais com a finalidade de avaliar as suas relações com infecções nosocomiais e melhor compreender a dinâmica das infecções na nossa região.

4. Material e Métodos

4.1. Isolados de *S. aureus* estudados

Foram estudados 89 isolados clínicos de *S. aureus*, 80 (Sa01 a Sa80) provenientes de um hospital geral universitário (hospital 1), 04 isolados (Sa82, Sa86, Sa87 e Sa89) provenientes de um segundo hospital geral universitário (hospital 2) e 05 (Sa81, Sa83, Sa84, Sa85 e Sa88) provenientes de um pronto de socorro cardiológico (hospital 3), todos obtidos de diferentes sítios de infecção e setores dos hospitais. Os isolados clínicos de *S. aureus* foram previamente identificados pelos hospitais e estão estocados a -80°C em glicerol-BHI na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do CPqAM (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz). Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do CPqAM (CAAE: 0024.0.095.000-07).

Para identificação das bactérias isoladas, os laboratórios de análises bacteriológicas dos hospitais analisaram características fenotípicas das colônias crescidas em Agar Sangue (produção de hemolisina e pigmentos), além da utilização da técnica de coloração de gram e provas bioquímicas clássicas para identificação de *S. aureus*.

4.2. Extração do DNA genômico bacteriano

Para a realização do trabalho, os isolados de *S. aureus* foram plaqueados em Ágar Sangue e incubados a 37°C por 24 horas, com o objetivo de confirmar a pureza das

culturas. Em seguida colônias isoladas foram repicadas individualmente e crescidas em BHI (Infusão de Cérebro e Coração, Biobrás) para extração do DNA.

O DNA dos isolados foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico como descrito em Freitas e colaboradores (2008) e utilizado nas diferentes reações de PCR. As células foram lisadas utilizando 10µL de solução de lisozima (10mg/mL) e 10µL de solução de proteinase K (5mg/mL). O DNA genômico foi ressuspenso em 10µL de água deionizada estéril. Uma alíquota (1µL) foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), corado com 15µL de SYBR Safe (Invitrogen), a 120V. Após a migração, o DNA foi observado e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A quantificação do DNA foi realizada por comparação com quantidade padrão de DNA do fago λ clivado com enzima de restrição *HindIII* (marcador) usando o programa 1D Image Analysis Software, version 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Câmera.

O DNA utilizado nas técnicas de MLST, análise do polimorfismo do gene *spa* e caracterização do *SCCmec* foi extraído de forma automatizada utilizando o equipamento NucliSens-easyMAG (bioMérieux), sendo confirmado através da PCR do gene *spa*. O produto de PCR foi corado com GelRed (Phoenix research), visualizado e fotografado em transiluminador de luz UV (Molecular Imager Gel Doc™ XR System).

4.3 Pesquisa dos genes toxigênicos e cluster *egc* em *S. aureus*

Duas reações de PCR multiplex foram preparadas; uma designada para detectar os genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea-see*) e outra para detectar os genes *tst*, *eta* e *etb* com *primers* desenhados como descrito por Becker, Roth e Peters (1998) (tabela 3).

As reações para PCR multiplex foram preparadas para um volume final de 25µL contendo 20pmol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl, pH 9,0, 50mM de KCl, 160µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 3mM de MgCl₂, 20ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas num termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos, compreendendo 95°C para desnaturação da fita de DNA por 1minuto, 60°C para anelamento dos *primers* por 1 minuto e 72°C para síntese do DNA por 2 minutos. Como controle da especificidade das reações de PCR, foram utilizadas as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA); FRI MN8 portadora do gene *tst*, FRI 722 portadora do gene *sea*, FRI S6 gene *seb*, FRI 361 genes *sec*, *sed*, *seg*, *sei* e *sej* e FRI 1151 gene *sed*, cedidas gentilmente pelo Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG).

Foram realizadas reações de PCR uniplex para a pesquisa dos genes toxigênicos *sej*, *sek*, *sel* e do cluster *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) utilizando os *primers* descritos por Omoe et al. (2002), Rosec; Gigaud (2002), Chiang et al. (2006) e Blaiotta et al. (2004) (Tabela 3). As reações de PCR foram realizadas como descrito anteriormente, exceto pela utilização de 1,5mM do MgCl₂ e 1U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Foram utilizadas como controles positivos as cepas padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos

genes *seg*, *sei* e *sej*, as cepas 1SB e 3SB (bacterioteca do CPqAM) portadoras dos genes *sek*, *sel* e *sem*, cepa Sa41 (bacterioteca do CPqAM), portadora dos genes *sen* e *seo* e a cepa CR6 (bacterioteca do CPqAM) portadora do gene *seh*.

Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com SYBR Safe (Invitrogen), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Alguns amplicons foram purificados e sequenciados para confirmar a identidade dos genes encontrados depositados em banco de dado público (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa blast versão 2.2.25 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes de *sea*, *see*, *seg*, *seo*, *tst*, *eta* e *etb* nos *S. aureus* estudados.

Gene	Primer	Sequência de <i>primers</i> (5'→ 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referências
sea	SEA-3b	CCTTTGGAACGGTTAAAACG	127	Becker, Roth e Peters, 1998
	SEA-4b	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC		
seb	SEB-1c	TCGCATCAAACGACAAACG	477	Becker, Roth e Peters, 1998
	SEB-4b	GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC		
sec	SEC-3b	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271	Becker, Roth e Peters, 1998
	SEC-4b	TCAAAATCGGATTAACATTATCC		
sed	SED-3b	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	319	Becker, Roth e Peters, 1998
	SED-4b	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC		
see	SEE-3b	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178	Becker, Roth e Peters, 1998
	SEE-2c	TAACCTACCGTGGACCCTTC		
tst	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445	Becker, Roth e Peters, 1998
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCCATACTTT		
eta	ETA-3b	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119	Becker, Roth e Peters, 1998
	ETA-4b	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC		
etb	ETB-3b	ACGGCTATATACATTCAATTCAATG	262	Becker, Roth e Peters, 1998
	ETB-4b	AAAGTTATTCATTTAATGCACTGTCTC		
seg	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400	Rosec e Gigaud, 2002
	SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG		
seh	SEH-1	TCACATCATATGCGAAAGCAG	357	Rosec e Gigaud, 2002
	SEH-2	TAGACCAATCACCCCTTTCC		

Gene	Primer	Sequência de primers (5'→ 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referências
sei	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454	Omoe et al., 2002
	SEI-2	ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG		
sej	SEJ-1	CAGCGATAGCAAAAATGAAACA	426	Rosec e Gigaud, 2002
	SEJ-2	TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA		
sek	SEK-1	CACAGCTACTAACGAATATC	378	Chiang et al., 2006
	SEK-2	TGGAATTTCTCAGACTCTAC		
sel	SEL-1	CATACAGTCTTACTAACGG	275	Chiang et al., 2006
	SEL-2	TTTTCTGCTTTAGTAACACC		
sem	SEM-1	CTTGTCCTGTTCCAGTATC	329	Chiang et al., 2006
	SEM-2	ATACGGTGGAGTTACATTAG		
sen	SEN-1	ATTGTTCTACATAGCTGCAA	682	Blaiotta et al., 2004
	SEN-2	TTGAAAAAACTCTGCTCCCA		
seo	SEO-1	AGTCAAGTGTAGACCCTATT	534	Blaiotta et al., 2004
	SEO-2	TATGCTCCGAATGAGAATGA		

4.4 Susceptibilidade à meticilina e caracterização do SCCmec

Rotineiramente, a detecção de resistência de *S. aureus* à meticilina é realizada pelo método de difusão em discos de oxacilina. Esta droga, representante da classe das penicilina-penicilinase resistentes (PRP), é indicada por ser mais resistente à degradação e mais sensível para detecção de heterorresistência do que os discos de meticilina (ROSSI; ANDREAZZI, 2004).

De acordo com o CLSI (2012), preconiza-se o uso de discos do antibiótico cefoxitina para detectar resistência à oxacilina/meticilina, visto que o halo de inibição do crescimento microbiano é maior e permite melhor visualização e leitura do resultado, sendo preferível ao uso de oxacilina. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) ou teste de microdiluição é outro teste utilizado para determinação da resistência a oxacilina, realizado para confirmação dos resultados dos testes de disco difusão (ROSSI e ANDREAZZI, 2004). A técnica de PCR fornece resultados seguros na detecção do gene de resistência à meticilina e é considerada “padrão ouro” para esta análise (FLUIT et al.,

2001). Dessa forma, foram realizados testes de susceptibilidade à oxacilina (1µg), cefoxitina (30µg) e microdiluição (CMI) de acordo com as normas do CLSI (2012) para inferir a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados à meticilina. A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

A identificação do SCC*mec* foi realizada em todos os isolados através de duas reações de PCR multiplex para verificar a presença de segmentos do SCC*mec* dos tipos I a V, que são os principais tipos observados em isolados clínicos (Tabela 4). O método foi descrito por Kondo e colaboradores (2007), no qual as PCRs foram denominadas MPCR-1, para identificação de cinco tipos de complexo *ccr* (*ccrAB1*[1], *ccrAB2*[2], *ccrAB3*[3], *ccrAB4*[4], e *ccrC*[5]), com amplificação do gene *mecA* (fragmento de 286pb) como controle interno da reação; e MPCR-2 que identifica os tipos A a C do complexo *mec*. Os seguintes isolados de *S. aureus* foram utilizados como controles positivos e cedidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC): MRSA NCTC10442 (SCC*mec*I, complexo *mec* tipo B, *ccr1*), MRSA N315 (SCC*mec*II, complexo *mec* tipo A, *ccr2*), MRSA 85/2082 (SCC*mec*III, complexo *mec* tipo A, *ccr3*), MRSA1 (SCC*mec*IV, complexo *mec* tipo B, *ccr2*), MRSA WIS (SCC*mec*V, complexo *mec* tipo C, *ccr5*) (McDOUGAL et al., 2003) (Tabela 4).

Os isolados SCC*mec*III apresentam complexo *ccr3* que apresenta um fragmento de 1.791pb. Na multiplex MPCR-1, utilizada para identificação dos tipos de complexo *ccr*, pode ocorrer a ausência do fragmento de 1.791pb nos isolados SCC*mec*III e a presença de um fragmento de 518pb consistente com o complexo *ccr5* nos isolados (Tabela 4). Isto ocorre, pois o SCC*mec*III carrega outro elemento de cassete cromossômico estafilocócico inserido, o SCC*mercury*, que contém o complexo *ccr5*. Foram realizadas PCRs uniplex para diferenciar os complexos *ccr* tipos 3 e 5 em todos os isolados que amplificaram

apenas um fragmento de 518pb. Esta identificação foi realizada na Universidade de Pittsburgh, no Laboratório de Epidemiologia em Doenças Infecciosas (PHIDL).

Tabela 4. Tipos de SCCmec investigados, seus respectivos complexos *mec* e *ccr* associados à *S. aureus*, tamanho do produto amplificado e controles positivos utilizados nas reações de PCR.

SCCmec	Complexo <i>mec</i>	Tamanho do amplicon (pb)	Complexo <i>ccr</i>	Tamanho do amplicon (pb)	Controles
I	B	2827	1	695	NCTC10442
II	A	1963	2	937	MRSA N315
III	A	1963	3	1.791 e 518	MRSA 85/2082
IV	B	2827	2	937	MRSA1
V	C	804	5	518	MRSA WIS

As reações de PCR consistiram de uma mistura de 20pmol de cada *primer*, 2,5 mM de cada dNTP, 25mM do MgCl₂, 10mM do Tris-HCl pH9, 50mM de KCl, 20ng do DNA genômico e 5U/μl da AmpliTaq Gold DNA polimerase (Promega) para um volume final de 50μL. As amplificações dos genes foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (m/v), corados com GelRed (Phoenix research), visualizado e fotografado em transiluminador de luz UV (Molecular Imager Gel Doc™ XR System).

4.5 Pesquisa do gene da coagulase (*coa*) em *S. aureus*

A região 3'- terminal do gene *coa* foi amplificada utilizando os seguintes *primers* específicos COAG2 (5' ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') e COAG3 (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3') descritos por Aarestrup, Dangle e Sordillo (1995). As reações de amplificação foram realizadas com os mesmos parâmetros utilizados para as PCRs uniplex do tópico 4.3. Como controle positivo da reação, foi utilizada a cepa padrão de *S. aureus* ATCC25923.

4.6 Ribotipagem-PCR

Para amplificação da região 16S-23S, foi utilizado um par de oligonucleotídeos descritos por Jensen, Webster e Straus (1993) [RIB] (5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3' e 5'-CAA GGC CAC CGT-3'). As reações de amplificação foram realizadas com os mesmos parâmetros utilizados para as PCRs multiplex do tópico 4.3, com exceção da eletroforese dos amplicons que foi realizada em gel de agarose a 2.0% (m/v). Como controle positivo da reação foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC25923.

4.7 Tipagem molecular pelo polimorfismo do gene *spa*

A região X do gene *spa* foi amplificada por PCR com os *primers* 1095F e 1517R como descrito por Shopsis e colaboradores, 1999 (Figura 18).

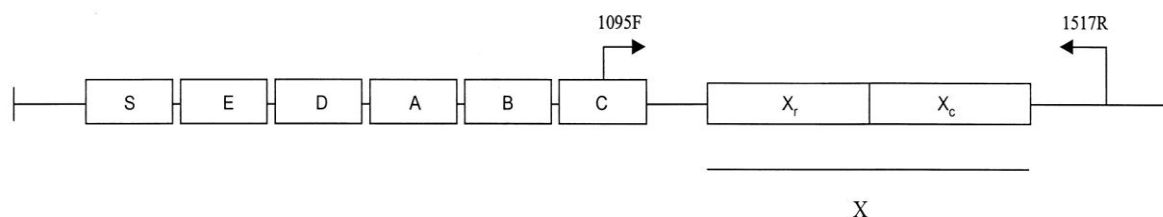


Figura 18. Representação esquemática do gene *spa*, mostrando a localização do pareamento dos *primers* F (1095) e R (1517) em regiões bem conservadas e flangeadoras da região X. Os retângulos A-E e S indicam sequências que codificam regiões de ligação à imunoglobulina G e uma sequência sinal, respectivamente. (Xr) região composta de um número variável SSRs de 24pb; (Xc) corresponde a uma sequência que codifica a região de fixação da proteína A à parede celular C-terminal da bactéria.

Fonte: Shopsisin et al. (1999).

Após a PCR, os produtos foram sequenciados e os tipos de gene *spa* foram determinados pela análise com o software Ridom StaphType (versão 1.5.21, Ridom GmbH, Würzburg, Alemanha) utilizando o Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de/>) (Harmsen et al., 2003) (Figura 19). Através da inserção das sequências flangeadoras (5'GCACCAAAA; 3'TACATGTCGT) da região Xr, o programa permite selecionar esta região para que seja analisado e determinado o tipo de gene *spa* (t) em cada isolado de *S. aureus* de acordo com o número e o tipo de SSR presente.

As seguintes cepas de *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo: MRSA1 (ST1, t316), MRSA WIS (ST45, t123), MRSA 85/2082 (ST239, t037), MRSA N315 (ST5, t002), MRSA NCTC10442 (ST250, t008). Foi possível agrupar os tipos de gene *spa* em *spaCC*, utilizando o algoritmo BURP, software Ridom StaphType. O parâmetro para determinação dos *spaCC* é agrupar os tipos de *spa* que apresentem uma diferença de menos de quatro *repeats*, assim como excluir da análise tipos de *spa* menores de cinco *repeats* (MELLMANN et al., 2007; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

(A)



Fonte: (A) SeqNet.org (<http://www.seqnet.org/>) (2013); (B) Harmsen et al. (2003).

4.8 MLST

O método de MLST foi realizado como descrito por Enright e colaboradores (2000), utilizando *primers* para os seguintes genes *housekeeping*; *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*. Os *primers* foram desenhados utilizando sequências de regiões altamente conservadas que flanqueiam regiões mais variáveis dos genes. Cada par de *primer* amplifica um fragmento interno de cerca de 500 a 600pb, permitindo sequenciar precisamente um fragmento de 402 a 516pb (variando de acordo com o gene em questão) de cada fita de DNA de cada gene analisado (Tabela 5).

Tabela 5. Sequência de *primers* utilizados no método de MLST para os genes *housekeeping* *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*, evidenciando o tamanho dos fragmentos sequenciados.

Gene	Primer	Sequência de <i>primers</i> (5' → 3')	Fragmento sequenciado (pb)
<i>arcC</i>	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTTC GGTGTGTATTAAATAACGATATC	456
<i>glpF</i>	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
<i>gmk</i>	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	429
<i>pta</i>	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	474
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402
<i>yqiL</i>	<i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

A análise dos cromatogramas e das sequências foi realizada utilizando o software Lasergene's SeqMan Pro package (version 10.0.1, DNASTAR). As sequências obtidas foram submetidas ao banco de dados público internacional MLST (<http://saureus.mlst.net>), para obtenção do perfil alélico e determinação do ST dos isolados (Figura 20). De acordo

A amplificação, purificação e sequenciamento dos genes foi realizado como descrito anteriormente na análise do gene polimórfico *spa* nos isolados de *S. aureus*, utilizando as mesmas cepas de *S. aureus* descritas como controle positivo.



Figura 20. (A) Interface do software Lasergene's SeqMan Pro package (version 10.0.1, DNASTAR) para análise dos cromatogramas e das sequências obtidas. (B) Interface do banco de dados públicos internacional MLST (<http://saureus.mlst.net>) para obtenção do perfil alélico e determinação do ST dos isolados.

Fonte: Autor.

4.9 PFGE

Todos os 89 isolados de *S. aureus* foram submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) como descrito por McDougal e colaboradores (2003), onde colônias crescidas em BHI (24 h) foram ressuspensas em tampão de suspensão celular (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0). A densidade ótica da suspensão foi mensurada em espectrofotômetro (610 nm) e ajustada para 3.0, adicionando-se em seguida 3 µL de lisostafina (1 mg/mL) em cada amostra. Para confecção dos plugs, foram misturados rapidamente 200 µL da suspensão bacteriana, 200 µL de agarose Seakem Gold (Lonza) 1.8% (dissolvida em 10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0).

Para lise celular e purificação do DNA genômico, os plugs foram imersos em solução de lise (6 mM Tris-HCl; 100 mM EDTA, pH 8.0; 0,5% de Sarcosinato lauril sódio [Sarcosyl, Fisher]; 0,5% de Polioxietileno 20 cetil éter [Brij-58, Sigma] e 0,2% de Desoxicolato de sódio [Sigma]) incubados por 4 horas a 37°C e lavados posteriormente com TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0). Apenas 1/3 (≈3 mm) de cada plug foi utilizado na reação de macrorrestrição do DNA cromossomal. Estes fragmentos foram estabilizados em 200 µL do tampão de restrição IV 1x (Invitrogen) por 30 min a 37°C. O tampão de restrição foi substituído por 200 µL de tampão de restrição IV 1x e 30 U de *Sma*I (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 24 h a 25°C.

Os plugs foram inseridos em gel de agarose 1% Seakem Gold (Lonza) dissolvida em TBE 0.5x (44.5 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0; 44.5 mM ácido bórico). A eletroforese foi realizada com o sistema CHEF DR III (BioRad), sob voltagem de 6 V/cm a 14°C por 21 horas, com pulsos iniciais de 5 segundos e finais de 40 segundos. A cepa padrão NRS77

foi usada como controle positivo da reação. Os géis foram corados com GelRed (Phoenix Research) e as imagens foram capturadas conforme descrito anteriormente (tópico 4.8). Os padrões de PFGE dos isolados foram comparados com os das cepas de referência USA100, USA300, USA1000, USA500, USA900, USA400, USA600, USA700, USA800, USA1100 and USA1200, provenientes do CDC (McDougal et al., 2003).

O grau de homologia entre as amostras tipadas pelo PFGE foi determinado pelo coeficiente de Dice (Dice, 1945). Para representação hierárquica da ligação entre os isolados, foi gerado um dendrograma, calculado por UPGMA, através do programa BioNumerics v. 6.5 (Applied-Maths) (Figura 21), com otimização e tolerância de 1.5%. Os isolados com grau de similaridade >80% foram considerados pertencentes ao mesmo cluster e intimamente relacionados, atendendo também os padrões de agrupamento descritos por Tenover et al. (1995).

O PFGE, assim como a tipagem molecular pelo polimorfismo do gene *spa* e MLST também foram realizadas na Universidade de Pittsburgh, no Laboratório de Epidemiologia em Doenças Infecciosas (PHIDL).



Figura 21. (A e B) Interfaces do programa BioNumerics v. 6.5 (Applied-Maths).

Fonte: Autor.

5. Resultados

5.1 Pesquisa dos genes toxigênicos e cluster *egc* em *S. aureus*

Todos os 89 isolados de *S. aureus* analisados foram positivos para os genes toxigênicos, amplificando os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seh*, *sej*, *sek*, *sel*, *eta*, *tst* e os genes que fazem parte do cluster *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sem* e *seo*), separadamente ou em associações. Entretanto, nenhum dos isolados analisados possuía os genes *sed*, *see* e *etb* (Figura 22).

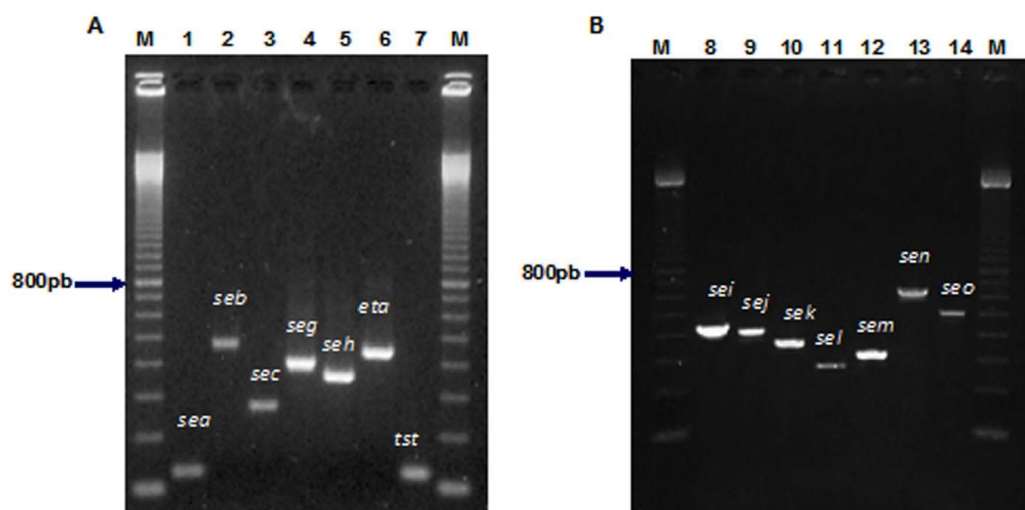


Figura 22. (A e B) Géis representativos dos produtos de amplificação da PCR dos genes toxigênicos nos isolados de *S. aureus*. **(A)** Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Coluna 1-Sa50 (*sea*, 127pb), Coluna 2- Sa14 (*seb*, 477pb), Coluna 3- Sa32 (*sec*, 271pb), Coluna 4- Sa63 (*seg*, 400pb), Coluna 5- Sa26 (*seh*, 357pb), Coluna 6- Sa80 (*eta*, 445pb), Coluna 7- Sa17 (*tst*, 119pb). **(B)** Coluna 8- Sa76 (*sei*, 454pb), Coluna 9- Sa73 (*sej*, 426pb), Coluna 10- Sa76 (*sek*, 378pb), Coluna 11- Sa44 (*sel*, 275pb), Coluna 12- Sa79 (*sem*, 329pb), Coluna 13- Sa80 (*sen*, 682pb), Coluna 14- Sa83 (*seo*, 534pb), Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder).

O gene mais frequentemente observado foi *seg*, presente em 88/89 (99%) isolados, seguido por *sem* 81/89 (91%), *seo* 80/89 (90%), *sen* 78/89 (88%), *sei* 74/89 (83%), todos integrantes do cluster *egc* (Figura 23).

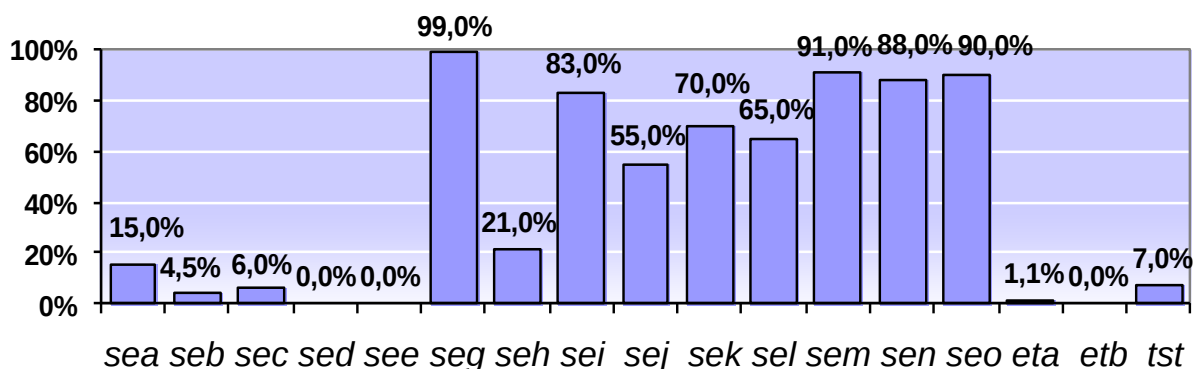


Figura 23. Frequência dos genes *sea*-*see*, *seg*-*seo*, *eta*, *etb* e *tst* nos isolados de *S. aureus*.

Os isolados de *S. aureus* comportaram de 03 a 12 genes toxigênicos e apenas 01 isolado (Sa87) comportou 12 genes toxigênicos dentre os 17 genes de exotoxinas investigados. Todos os isolados analisados possuíram o cluster *egc* contendo todos os genes que fazem parte do mesmo ou apenas parte deles. Dos 89 isolados de *S. aureus* estudados, 63 (71%) comportaram os cinco principais genes que compõem o cluster (*seg* + *sei* + *sem* + *sen* + *seo*) e, dessa forma, revelaram a presença do cluster *egc* completo nesses isolados. O termo “cluster *egc* completo” será utilizado para designar o cluster *egc* composto pelos cinco principais genes que o compõem e que foram investigados no nosso estudo (Tabelas 6 e 7).

Quando comparamos a presença do cluster *egc* completo com as exotoxinas analisadas neste estudo, observamos a presença de 25 genótipos distintos. Dentre esses, os genótipos mais observados foram *egc* + *sej* + *sek* + *sel* em 10/63 (15,9%) isolados, *egc*

+ *sek* em 8/63 (12,7%) isolados e *egc* + *sek* + *sel* em 7/63 isolados (11,1%) (Tabela 6). Um isolado (Sa87), oriundo de secreção traqueal de um paciente proveniente da UTI, amplificou a cluster *egc* em associação com mais sete genes toxigênicos (*sea*, *sec*, *seh*, *sej*, *sek*, *sel* e *tst*) e apenas 02 isolados amplificaram o cluster *egc* completo sem amplificação de outros genes toxigênicos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Associação dos isolados de *S. aureus* que comportaram o cluster *egc* completo com outros genes toxigênicos analisados.

Genótipos	Nº de isolados	Frequência (%)
1. <i>egc</i>	02	5,9
2. <i>egc</i> + <i>sej</i>	06	9,5
3. <i>egc</i> + <i>sek</i>	08	12,7
4. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>sej</i>	02	3,2
5. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>sek</i>	01	1,6
6. <i>egc</i> + <i>seh</i> + <i>sel</i>	01	1,6
7. <i>egc</i> + <i>sej</i> + <i>sel</i>	05	8,0
8. <i>egc</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i>	01	1,6
9. <i>egc</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	07	11,1
10. <i>egc</i> + <i>sek</i> + <i>eta</i>	01	1,6
11. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>sej</i> + <i>sel</i>	01	1,6
12. <i>egc</i> + <i>seb</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i>	01	1,6
13. <i>egc</i> + <i>seb</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	02	3,2
14. <i>egc</i> + <i>sec</i> + <i>sel</i> + <i>tst</i>	01	1,6
15. <i>egc</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i>	01	1,6
16. <i>egc</i> + <i>seh</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	01	1,6
17. <i>egc</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	10	15,9
18. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>seh</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	01	1,6
19. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>seh</i> + <i>sek</i>	01	1,6
20. <i>egc</i> + <i>sec</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i> + <i>tst</i>	01	1,6
21. <i>egc</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	02	3,2
22. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	03	4,8
23. <i>egc</i> + <i>sec</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i>	01	1,6
24. <i>egc</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i> + <i>tst</i>	02	3,2
25. <i>egc</i> + <i>sea</i> + <i>sec</i> + <i>seh</i> + <i>sej</i> + <i>sek</i> + <i>sel</i> + <i>tst</i>	01	1,6

O isolado Sa87, obtido de secreção traqueal e proveniente de um paciente da UTI, o isolado Sa08 (portador dos genes *sec*, *sek*, *sel* e cluster *egc* completo) proveniente de secreção vaginal de um paciente do ambulatório, assim como outros quatro isolados de *S. aureus* (Sa32, Sa80, Sa82 e Sa88), comportaram o gene *tst*, que é um dos principais responsáveis pela Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico. Apenas um isolado (Sa17, portador do gene toxigênico *sek* e do cluster *egc* completo), proveniente de amostra de urina de um paciente ambulatorial, comportou o gene *eta*, que é associado à Síndrome da Pele Escaldada (Tabela 7).

Os isolados provenientes de pacientes da UTI apresentaram associações entre 04 e 12 genes (Sa20, oriundo de sangue, comportou os genes *sek*, *sem*, *sen*, *seo*; Sa36, secreção traqueal, genes *sei*, *sej*, *sek*, *sel* e cluster *egc* completo; Sa47, ponta de cateter, genes *sej*, *sel* e cluster *egc* completo; Sa55, secreção traqueal, *seg*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*; Sa66, secreção traqueal, gene *sej* e cluster *egc* completo; e Sa87, secreção traqueal, genes *sea*, *sec*, *seh*, *sej*, *sek*, *sel* e cluster *egc* completo), demonstrando o elevado potencial de virulência destes isolados (Tabela 7).

Foram observados neste estudo cinco sítios de infecção por *S. aureus* mais frequentes: urina (18/89 [20,2%] isolados foram observados neste sítio de infecção, sendo 04 provenientes de pacientes da enfermaria e 14 do ambulatório), os genes toxigênicos observados nos isolados provenientes deste sítio foram *sea*, *seb*, *seg-seo* e *eta*; secreção e ponta de cateter/dreno e secreção de prótese (17/89 [19,1%] isolados, sendo 16 da enfermaria e 01 da UTI), genes *sea*, *sec*, *seg-seo* e *tst*; secreções diversas (17/89 [19,1%] isolados, sendo 08 da enfermaria 09 do ambulatório), genes *sea*, *seb*, *sec*, *seg-seo* e *tst*; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (11/89 [12,4%] isolados, sendo 09 da enfermaria e 02 do ambulatório), genes *sea*, *seg-seo* e *tst*; e cultura e secreção nasal,

traqueal, de orofaringe e nasoorofaringe (10/89 [11,2%] isolados, sendo 02 da enfermaria, 04 do ambulatório e 04 da UTI), genes *sea*, *sec*, *seg-seo* e *tst* (Figura 24 e Tabela 7).

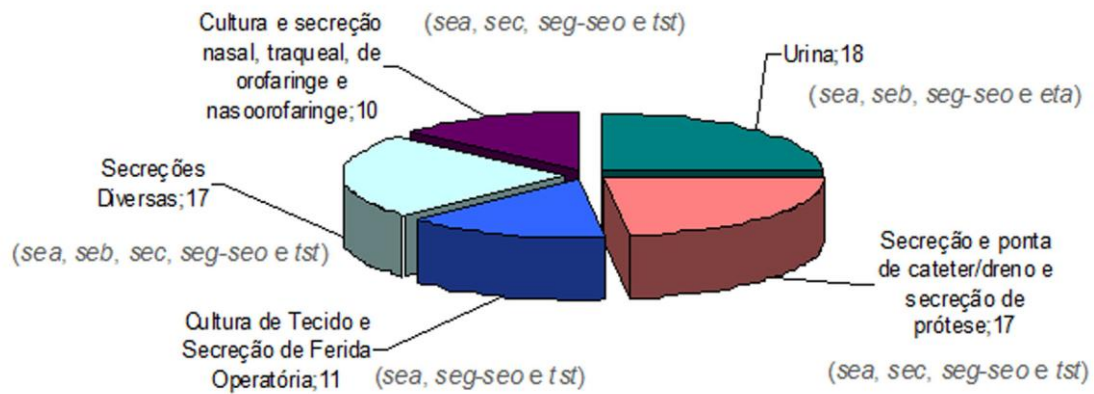


Figura 24. Sítios mais frequentes de isolamento de *S. aureus* nos pacientes e os genes das exotoxinas relacionados.

Tabela 7. Genes das exotoxinas, evidenciando os genes que compõem o cluster *egc*, sítios de infecção e setor de isolamento dos *S. aureus* nos hospitais.

(Continuação)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Sector de Isolamento no Hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sek</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>
Sa01	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Sa02	Secreção Uretral	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa03	Secreção Vaginal	Ambulatório	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Sa04	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Sa05	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa06	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa07	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa08	Secreção Vaginal	Ambulatório	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Sa09	Esperma	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Sa10	Secreção Uretral	Ambulatório	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa11	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa12	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa13	Urina	Ambulatório	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa14	Urina	Ambulatório	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa15	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa16	Urina	Ambulatório	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa17	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Sa18	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa19	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa20	Sangue	UTI	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa21	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa22	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa23	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-

S.aureus isolados	Sítio de Infecção	Sector de Isolamento no Hospital	sea	seb	sec	seg	seh	sei	sej	sek	sel	sem	sen	seo	eta	tst
Sa24	Secreção de Prótese	Enfermaria	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa25	Secreção de Ferida	Ambulatório	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa26	Ponta de Cateter	Enfermaria	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa27	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa28	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Sa29	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa30	Fragmento de Tecido	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa31	Fragmento Ósseo de Tíbia	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa32	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Sa33	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa34	Sangue	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa35	Secreção Ocular	Enfermaria	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa36	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa37	Secreção de Úlcera	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa38	Fragmento Ósseo	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa39	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa40	Abscesso da Coxa	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa41	Cultura de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa42	Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia	Enfermaria	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa43	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa44	Cultura de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa45	Secreção de Dreno Torácico	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-

S.aureus isolados	Sítio de Infecção	Sector de Isolamento no Hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sek</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>
Sa46	Cultura de Orofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa47	Ponta de Cateter	UTI	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa48	Secreção de Úlcera	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa49	Secreção de Orofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Sa50	Secreção Nasal	Ambulatório	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa51	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Sa52	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Sa53	Fragmento de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Sa54	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa55	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Sa56	Ponta de Dreno	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa57	Exsudado Purulento do Antebraço	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Sa58	Fragmento Ósseo de Quadril	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa59	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa60	Secreção de Ferida (Transplante)	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Sa61	Ponta de Dreno	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Sa62	Secreção de Abscesso Joelho	Enfermaria	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Sa63	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa64	Coleção Abdominal	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Sa65	Orofaringe	Enfermaria	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa66	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Sa67	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-

S.aureus isolados	Sítio de Infecção	Sector de Isolamento no Hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sek</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>
Sa68	Cultura de Secreção de Úlcera	Enfermaria	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Sa69	Tecido Superficial e Profundo	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa70	Secreção de Axila	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sa71	Secreção de Fístula	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa72	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Sa73	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Sa74	Secreção de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Sa75	Sangue	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Sa76	Secreção de Lesão Frontal	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Sa77	Secreção Ocular	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Sa78	Nasoorofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Sa79	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Sa80	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Sa81	Sangue	Emergência	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Sa82	Secreção Ocular/Câncer	Enfermaria	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sa83	Ferida Operatória	Emergência	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa84	Secreção Traqueal	Emergência	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa85	Sangue	Emergência	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sa86	Secreção	Enfermaria	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Sa87	Secreção Traqueal	UTI	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sa88	Sangue	Emergência	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sa89	Lesão de Tecido	Ambulatório	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(+): amplificação do gene; (-): ausência de amplificação do gene.

5.2 Susceptibilidade de *S. aureus* à metilicina e caracterização do SCCmec

Dos 89 isolados de *S. aureus* analisados, 31 (34,8%) foram oxacilina e cefoxitina resistentes através do antibiograma e, portanto considerados MRSA e 58 (65,2%) foram sensíveis aos antibióticos pelo antibiograma e considerados MSSA. São considerados resistentes isolados com halo de inibição ≤ 10 mm de diâmetro quando for utilizado disco de oxacilina e ≤ 21 mm de diâmetro quando for utilizado disco de cefoxitina (Figura 25). Os 31 isolados MRSA foram submetidos ao teste de microdiluição (CMI) com oxacilina e todos foram considerados resistentes à oxacilina/metilicina através deste teste também, com CMI entre 4 e $>128\mu\text{g/ml}$. De acordo com o CLSI (2012), são considerados MRSA os microrganismos com CMI $\geq 4\mu\text{g/ml}$.

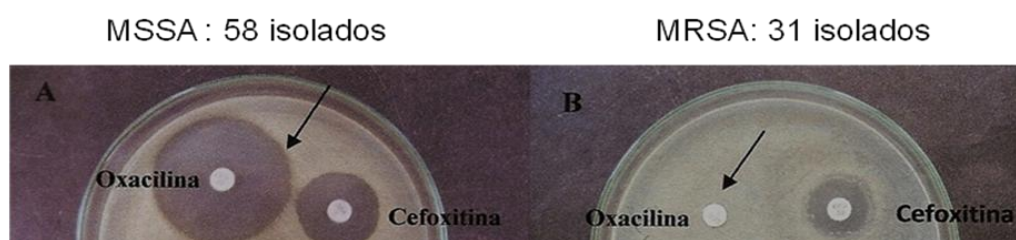


Figura 25. (A e B) Antibiogramas representativos com discos de oxacilina e cefoxitina para avaliar a susceptibilidade de *S. aureus* a metilicina. (A) Isolado considerado sensível à metilicina (Sa03) e representativo dos 58 isolados que apresentaram perfil de sensibilidade similar. (B) Isolado considerado resistente à metilicina (Sa66), representando os 31 isolados que exibiram características fenotípicas similares.

Foi realizada a caracterização do SCCmec em todos os isolados MRSA, onde 19/31 (61,3%) isolados foram considerados SCCmec tipo III (complexo *mec* tipo A e complexo *ccr3*), 11/31 (35,5%) foram considerados SCCmec tipo IV (complexo *mec* tipo B e complexo *ccr2*) e apenas 01 isolado foi considerado SCCmec tipo II (complexo *mec* tipo

A e complexo *ccr2*). Na PCR multiplex para amplificação do complexo *ccr*, houve adicionalmente a amplificação do gene *mecA* como controle interno da reação (Figura 26).

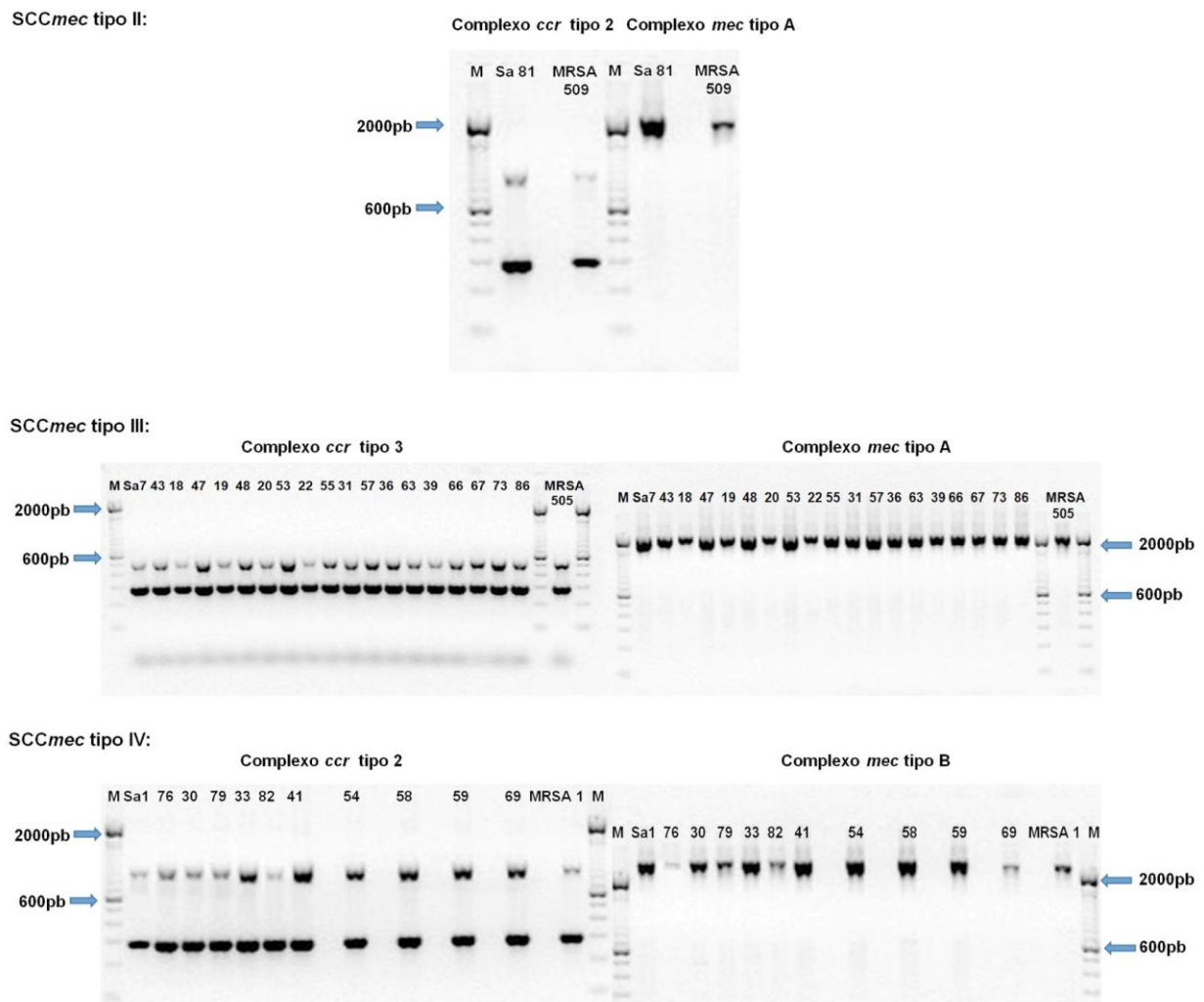


Figura 26. (A, B e C) Géis dos produtos de amplificação da PCR dos genes do complexo *mec*, *ccr* e gene *mecA* para caracterização do SCCmec dos isolados MRSA SCCmec tipos II, III e IV respectivamente. **(A)** Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Isolados que apresentaram complexo *ccr* tipo 2 (937pb), gene *mecA* (286 pb) e complexo *mec* tipo A (1963pb), cepa MRSA 509 (MRSA N315): controle positivo. **(B)** Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Complexo *ccr* tipo 3 (518pb), gene *mecA*, complexo *mec* tipo A (1963pb), cepa MRSA 505 (MRSA 85/2082): controle positivo. **(C)** Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Complexo *ccr* tipo 2 (937pb), gene *mecA*, complexo *mec* tipo B (2827pb), cepa MRSA 1: controle positivo.

Todos os isolados que apresentaram um fragmento de DNA de 518pb, na PCR multiplex para identificação do complexo *ccr*, foram submetidos a uma PCR uniplex para diferenciar os complexos *ccr3* e *ccr5*. Nenhum isolado tipado como SCCmecIII exibiu o fragmento de 1.791pb equivalente ao complexo *ccr3*, porém todos amplificaram o fragmento de 518pb correspondente ao *ccr5* na PCR multiplex. O fragmento de 1.791pb correspondente ao complexo *ccr3* foi observado nos isolados apenas pela PCR uniplex realizada (Figura 27)

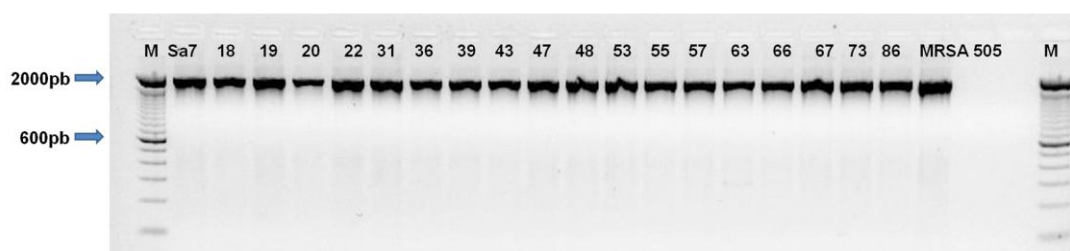


Figura 27. Gel do produto de amplificação da PCR do complexo *ccr3* nos isolados SCCmecIII. Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Isolados que apresentaram complexo *ccr* tipo 3 (1.791pb), cepa MRSA 505 (MRSA 85/2082): controle positivo.

Os 58/89 (65,2%) isolados restantes foram considerados MSSA, porém também foram submetidos à análise do SCCmec, para determinar se estes comportavam segmentos do cassete cromossômico *mec*. Vinte e cinco (43,1%) dos 58 isolados MSSA foram negativos para todos os genes do SCCmec investigados. Surpreendentemente, 30 (51,7%) isolados demonstraram a presença do gene *mecA*, dos quais 15 isolados também amplificaram o complexo *ccr* dos tipos 2, 3 e 5, sem amplificação do complexo *mec*. Os isolados Sa14 e Sa74 exibiram um produto de PCR muito fraco para os genes *ccr* e, portanto, foram desconsiderados da análise. Esses isolados foram denominados então de *S.aureus* oxacilina susceptíveis, *mecA*-positivos (OS-MRSA).

Três isolados não exibiram o gene *mecA*, porém comportavam o complexo *mec* tipo A (Sa5 e Sa21) e o complexo *ccr* tipo 5 (Sa56) (Figura 28). Todos os isolados MSSA que apresentaram um fragmento de DNA de 518pb, na PCR multiplex para identificação do complexo *ccr*, foram submetidos a uma PCR uniplex para diferenciar os complexos *ccr3* e *ccr5* como descrito anteriormente.

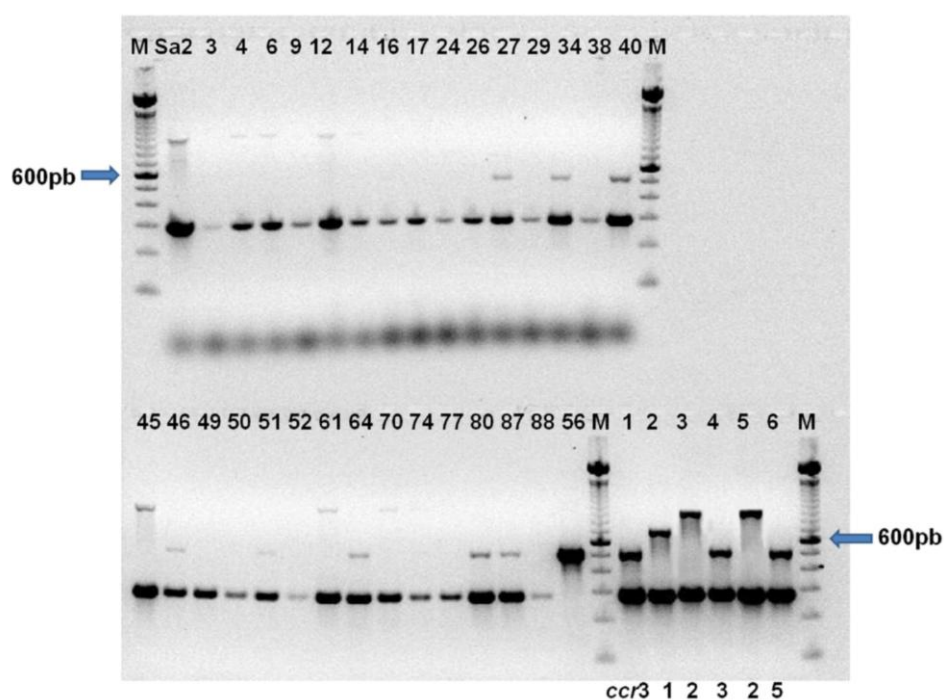


Figura 28. Gel dos produtos de amplificação da PCR correspondentes ao complexo *ccr* e gene *mecA* presentes nos isolados MSSA. Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). (Sa2, 4, 6, 12, 45, 61 e 70) Isolados que apresentaram complexo *ccr* tipo 2 (937pb) e gene *mecA* (286 pb); (Sa40, 80 e 87) complexo *ccr* tipo 3 (518pb) e gene *mecA*; (Sa27, 34, 46, 51 e 64) complexo *ccr* tipo 5 (518pb) e gene *mecA*; (Sa3, 9, 14, 16, 17, 24, 26, 29, 38, 49, 50, 52, 74, 77 e 88) amplificação apenas do gene *mecA*; (Sa56) amplificação do complexo *ccr* tipo 5, sem amplificação do gene *mecA*. Controles positivos: Coluna 1 ATCC33591 (*ccr3*, 518pb); Coluna 2 MRSA NCTC10442 (*ccr1*, 695pb); Coluna 3 MRSA N315 (*ccr2*, 937pb); Coluna 4 MRSA 85/2082 (*ccr3*, 518pb); Coluna 5 MRSA 1 (*ccr2*, 937pb) e Coluna 6 MRSA WIS (*ccr5*, 518pb).

5.3 Tipagem Molecular de *S. aureus*

Todos os 89 isolados analisados amplificaram o gene *coa* nas reações de PCR. A amplificação do gene *coa* nos *S. aureus* produziu cinco perfis genotípicos, desta forma, os isolados foram distribuídos em cinco coagulotipos, de acordo com o tamanho do segmento amplificado (Perfil 0= ~600pb, Perfil 1= ~700pb, Perfil 2= ~800pb, Perfil 3= ~900pb e Perfil 4= ~1000pb). A cepa utilizada como controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) amplificou um fragmento de ~800pb (Figura 29).

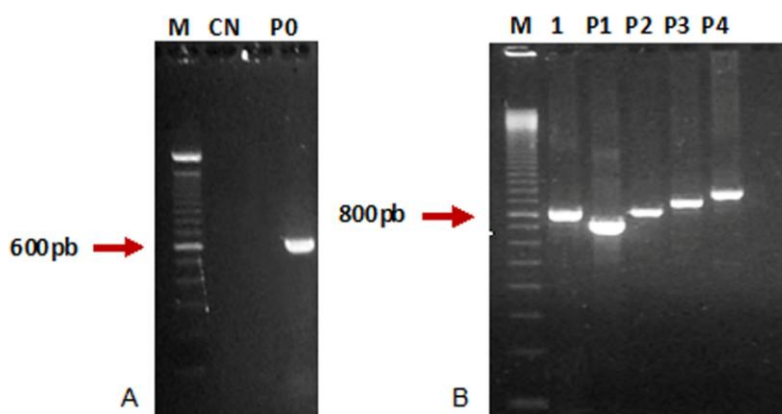


Figura 29. (A e B) Géis representativos dos produtos de PCR do gene *coa* dos isolados clínicos de *S. aureus*. (A) Marcador de peso molecular, linha M (100 pb DNA ladder). CN: controle negativo. P0= ~600pb. (B) Marcador de peso molecular, linha M (100 pb DNA ladder). Linha 1, controle positivo ~800pb (*S. aureus* ATCC 25923). Coagulotipos: P1= ~700pb, P2= ~800pb, P3= ~900pb e P4= ~1000pb.

O isolado Sa88, obtido de amostra de sangue de uma paciente do hospital 3, apresentou um coagulotipo de ~600pb, denominado neste estudo de perfil 0 (P0). A maioria dos isolados 44/89 (49%) amplificou um fragmento de ~800pb (P2). Este perfil foi observado em um isolado (Sa87) de paciente internado na UTI do hospital 2 proveniente

de secreção traqueal. O perfil 1 foi o segundo mais frequente 38/89 (43%), sendo o único presente em isolados de pacientes da UTI do hospital 1. O perfil 3 foi observado em apenas um isolado (Sa45) de paciente presente na enfermaria do hospital 1 e apenas cinco isolados amplificaram um fragmento de ~1000pb (P4) (Tabela 10).

Nas reações de ribotipagem-PCR dos 89 isolados analisados, foram observados de 03 a 07 fragmentos de tamanho aproximado de 380 a 680 pb. Com base nos padrões de amplificação, os isolados foram classificados em 15 ribotipos, denominados neste estudo de R1 a R15 (Figura 30).

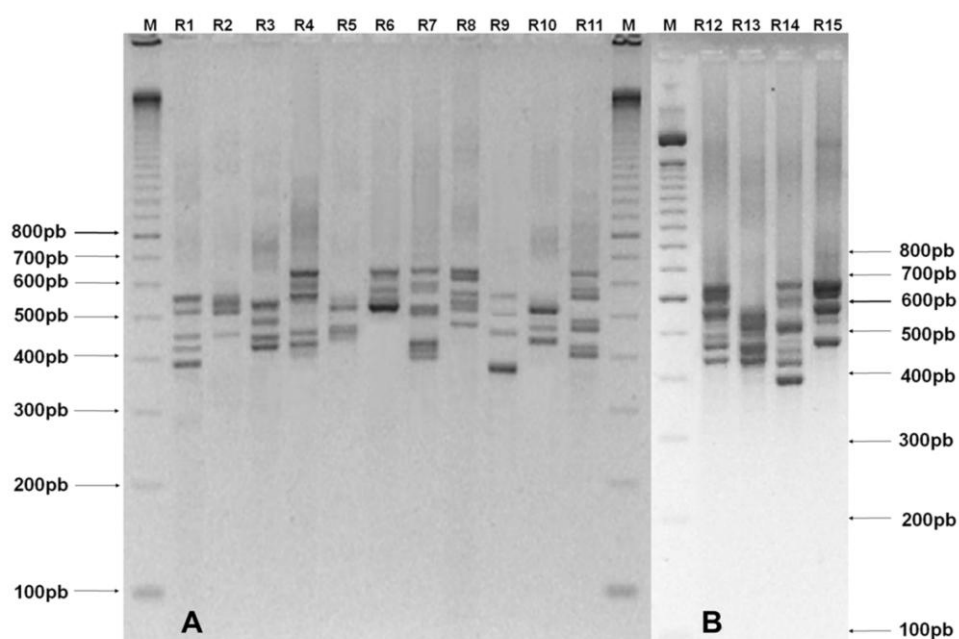


Figura 30. (A e B) Perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR dos isolados de *S. aureus*. (A) Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Ribotipos 1 a 11 (R1-R11). (B) Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Ribotipos 12 a 15 (R12-R15).

Neste estudo, os ribotipos mais frequentemente observados foram R1 e R4 presentes em 26/89 (29%) e 24/89 (27%) isolados, respectivamente. O R1 foi observado

no isolado Sa87, proveniente de um paciente da UTI do hospital 2, exibindo o genótipo P2/R1. O ribotipo R4 foi observado em isolados provenientes de pacientes do hospital 1 e em apenas um isolado de um paciente do hospital 2 (Sa86). Todos os isolados que comportaram o R4 exibiram o genótipo P1/R4, exceto o isolado Sa45 (P3/R4). Este ribotipo foi o único observado nos cinco isolados de pacientes da UTI do hospital 1. O R3 foi observado em 11/89 (12%) isolados, o R2 em 10/89 (11%) isolados e o R7 em 05/89 (7%) isolados. Todos os isolados que comportaram o R7 exibiram o genótipo P1/R7. Os ribotipos R5, R6, R8-R15 foram observados apenas em um ou dois isolados (Tabela 8).

Os isolados analisados neste estudo foram submetidos a PCR do gene *spa* (Figura 31) e, após a amplificação, a região polimórfica X do gene foi sequenciada e analisada para determinação do tipo de sequência presente nos isolados. Desta forma, os isolados foram agrupados em 30 tipos de *spa* de acordo com o número e o tipo de SSR presente na região X do gene *spa* dos mesmos (Tabelas 8 e 10).

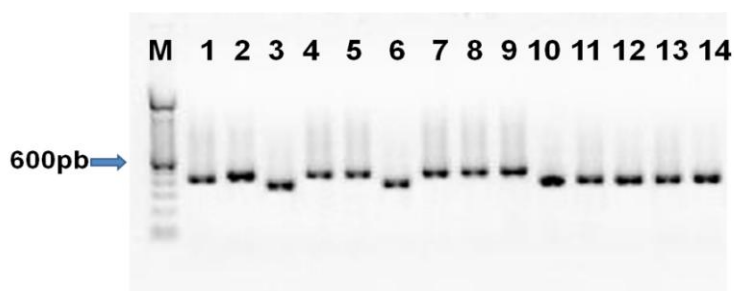


Figura 31. Perfis eletroforéticos representativos da região polimórfica X do gene *spa* dos isolados de *S. aureus*. Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*). Linha 1, Sa32; Linha 2, Sa24; Linha 3, Sa31; Linha 4, Sa23; Linha 5, Sa30; Linha 6, Sa22; Linha 7, Sa29; Linha 8, Sa21; Linha 9, Sa28; Linha 10, Sa20; Linha 11, Sa27; Linha 12, Sa19; Linha 13, Sa26 e Linha 14, Sa18.

Os tipos de gene *spa* t037 e t002 foram os mais frequentemente observados, presentes em 22/89 (25%) e 15/89 (17%) isolados, respectivamente. Os tipos de *spa* t084 e t318 foram observados em quatro isolados cada. Os outros tipos de gene *spa* foram observados em no máximo três isolados (Tabela 8).

Através da análise do gene polimórfico *spa*, foi possível descrever neste estudo dois tipos de gene *spa* desconhecidos até o momento (t10550 e t10548). Os isolados Sa4 e Sa8 amplificaram um tipo de gene *spa* nunca antes descrito, que foi submetido ao curador do banco internacional de dados públicos spaServer (<http://spaserver.ridom.de/>), onde foi denominado de t10550 (Tabela 8) e apresenta a sequência de *repeats* r373-r17-r34-r16-r34. O tipo t10550 é similar ao t938, exibindo dois *repeats* de diferença (**r479**-r17-**r31**-r16-r34). O t938 apresenta apenas uma descrição no banco de dados spaServer, sendo proveniente de um isolado MSSA do Reino Unido.

Dois outros isolados (Sa13 e Sa28), exibiram outro tipo de gene *spa* desconhecido, classificado como t10548 (r26-r23-r270-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16), após submissão ao curador do banco de dados spaServer (Tabela 8). O t10548 apresenta similaridade com o t5344 (r26-r23-**r309**-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16), exibindo apenas um *repeat* de diferença. O t5344 também apresenta apenas uma descrição no banco de dados spaServer, sendo proveniente de um isolado MSSA da Dinamarca.

Tabela 8. Tipos de gene *spa* observados nos isolados de *S. aureus*, evidenciando os tipos mais frequentes e os tipos desconhecidos descritos no estudo.

<i>spa</i> tipos	Nº de Isolados	<i>spa</i> tipos	Nº de Isolados
1. t037	22	16. t214	01
2. t002	15	17. t279	01
3. t084	04	18. t306	01
4. t318	04	19. t359	01
5. t127	03	20. t521	01
6. t267	03	21. t645	01
7. t433	03	22. t701	01
8. t2279	03	23. t1001	01
9. t021	02	24. t1102	01
10. t189	02	25. t1277	01
11. t10548*	02	26. t1451	01
12. t10550**	02	27. t1646	01
13. t1442	02	28. t2164	01
14. t056	01	29. t6787	01
15. t065	01	30. t9734	01

t10548* e t10550**: novos tipos de *spa* descritos no presente estudo.

Não foi possível determinar o tipo de gene *spa* em cinco isolados. Os isolados MSSA Sa17 e Sa38 amplificaram o gene *spa* como esperado, porém o sequenciamento não foi satisfatório para análise com o software Ridom StaphType após diversas repetições e foi impossível determinar o tipo de gene *spa* dos mesmos. Três isolados MRSA (Sa41, Sa58 e Sa59) não amplificaram o gene *spa*, possivelmente por algum problema no pareamento dos *primers* e foram considerados isolados não tipáveis (NT).

Na análise de MLST, os isolados de *S. aureus* foram agrupados em 21 tipos de sequência (ST's), definidos pelos alelos de cada um dos sete genes *housekeeping* presentes nos isolados, após PCR e sequenciamento dos mesmos (Figura 32, Tabelas 9 e 10).

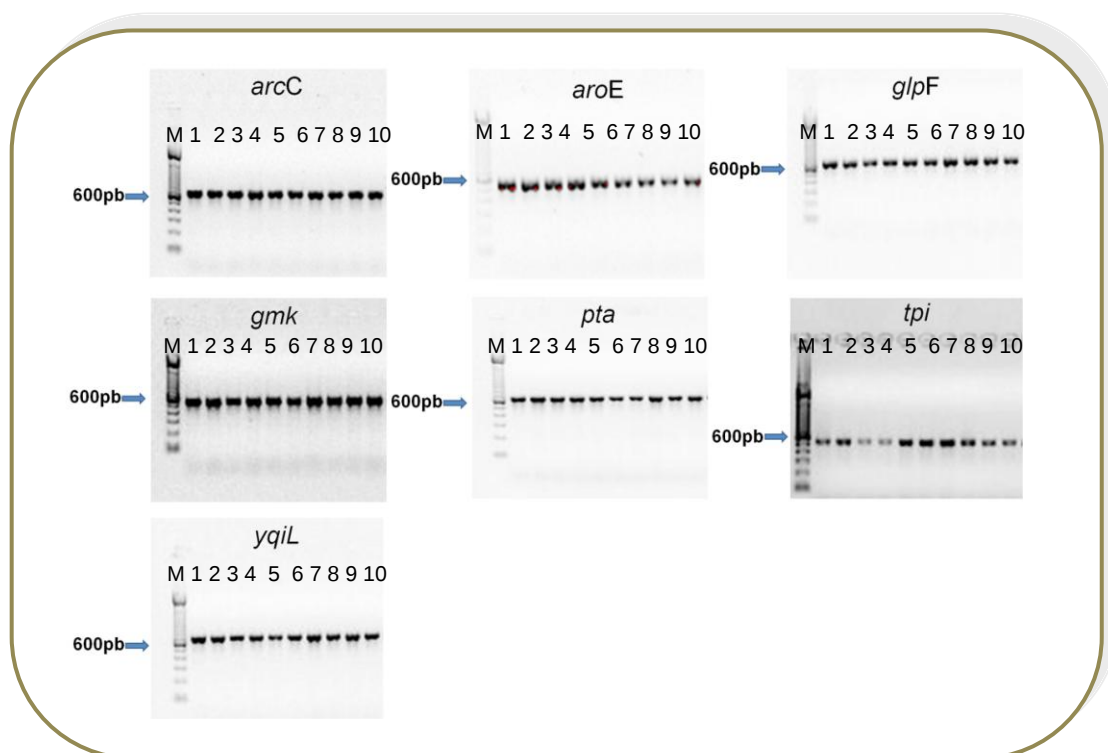


Figura 32. Perfis eletroforéticos representativos dos genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* (≈600pb) presentes nos isolados de *S. aureus*. Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Linha 1, Sa2; Linha 2, Sa14; Linha 3, Sa22; Linha 4, Sa30; Linha 5, Sa44; Linha 6, Sa55; Linha 7, Sa62; Linha 8, Sa72; Linha 9, Sa82 e Linha 10, Sa88.

Os ST5 e ST239 foram os mais frequentemente observados no estudo, presentes em 22/89 (25%) e 21/89 (24%) isolados, respectivamente. O ST30 foi observado em 09/89 (10%) isolados e os ST1 e ST333 foram observados em 05/89 (6%) isolados. Os outros ST's foram observados em no máximo três isolados (Tabela 9).

O isolado Sa1 foi classificado como *spa* tipo t002, porém quando analisado para os genes do MLST, nós observamos um novo alelo do gene *tpi* (denominado de *tpi* 264), exibindo 99% de similaridade com o alelo 1 do gene *tpi*. Desta maneira, foi possível descrever neste estudo um tipo desconhecido de ST, que foi previamente submetido ao curador do banco de dados público internacional MLST (<http://saureus.mlst.net>) e

denominado posteriormente de ST2381 (perfil alélico 1-4-1-4-12-**264**-10) (Tabela 9), apresentando similaridade com o ST5 (perfil alélico 1-4-1-4-12-**1**-10), pertencendo ao mesmo complexo clonal dos isolados ST5 (complexo clonal 5 [CC5]), associados ao clone pediátrico.

A análise de MLST permitiu identificar dois outros ST's desconhecidos (ST2382 e ST2383) (Tabela 9), também submetidos ao curador do banco de dados MLST. Dois isolados OS-MRSA (Sa61 e Sa64) exibiram o novo tipo de sequência denominado ST2382 (perfil alélico 3-1-**18**-8-1-1-1) (Tabela 9), similar ao ST188, porém comportando o alelo 18 ao invés do alelo 1 do gene *glpF* do ST188 (3-1-**1**-8-1-1-1); esses isolados foram classificados como *spa* tipo t189. O isolado MSSA Sa85, classificado como t2279, também comportou um novo tipo de MLST, no qual observamos um novo alelo do gene *yqiL* (*yqiL* 267), exibindo 99% de similaridade com o alelo 1 do gene *yqiL*. Desta forma, foi possível descrever outro novo tipo de sequência multilocus (ST2383, perfil alélico 1-1-1-1-1-**267**-1), similar ao ST1 (perfil alélico 1-1-1-1-1-**1**-1), fazendo parte do mesmo complexo clonal dos isolados ST1 (CC1), associados ao clone USA400 (ST1-SCC*mecIV*).

Dois isolados OS-MRSA (Sa4 e Sa9) falharam na amplificação de todos os genes utilizados na análise de MLST, desta forma, esses isolados foram considerados não-tipáveis. O Sa9 foi classificado como t037 e o isolado Sa4 amplificou o novo *spa* tipo t10550.

Tabela 9. Tipos de sequência multilocus (ST's) observados nos isolados de *S. aureus*, evidenciando os tipos mais frequentes e os tipos desconhecidos descritos no estudo.

ST's	Nº de Isolados	ST's	Nº de Isolados
1. ST1	05	12. ST239	21
2. ST5	22	13. ST285	01
3. ST6	01	14. ST333	05
4. ST15	02	15. ST398	01
5. ST25	01	16. ST669	01
6. ST30	09	17. ST718	02
7. ST45	03	18. ST1635	03
8. ST97	03	19. ST2381*	01
9. ST101	01	20. ST2382**	02
10. ST105	01	21. ST2383***	01
11. ST120	01		

ST2381*, ST2382** e ST2383***: novos ST's descritos no presente estudo.

A análise dos macrofragmentos de restrição separados por PFGE revelou quatro clusters predominantes entre os 31 isolados considerados MRSA no estudo e foram denominados de clusters A a D. Adicionalmente, quatro outros clusters predominantes foram observados na análise dos 58 isolados MSSA e foram denominados de clusters E a H. Vários clusters agruparam isolados relacionados a clones epidêmicos internacionais e apenas alguns isolados com genótipos únicos (singletons) e não incluídos em cluster, foram individualmente relacionados a clones epidêmicos. Os perfis de PFGE e outras características dos isolados MRSA e MSSA (incluindo os OS-MRSA) podem ser observados nas figuras 33 e 34 e na tabela 10.

Em relação aos isolados MRSA, todos os 19 isolados que exibiram o SCCmecIII foram classificados como ST239, quando analisado pelo MLST e t037 na análise do gene

spa. Desta forma, esses isolados foram considerados relacionados ao clone BEC, um HA-MRSA pandêmico e predominante nos hospitais do Brasil como mencionado anteriormente.

No presente estudo, nós observamos uma variabilidade nos padrões de PFGE dos isolados relacionados ao BEC (SCC*mec*III-ST239, t037), que foram agrupados nos clusters A e B, exibindo 78,9% de similaridade entre eles pelo coeficiente de Dice. Dos isolados BEC, apenas 04 (Sa36, Sa39, Sa43 e Sa55) não foram agrupados em clusters, embora o isolado Sa55 (pulsotipo 10) tenha demonstrado 79,9% de similaridade com o cluster A (Figura 33).

Todos os cinco isolados da UTI do hospital 1, obtidos de ponta de cateter (Sa47, pulsotipo 7, cluster A), sangue (Sa20, pulsotipo 8, cluster A) e secreção traqueal (Sa36, pulsotipo 17; Sa55, pulsotipo 10 e Sa66, pulsotipo 14, cluster B) foram classificados como BEC. Todos os isolados relacionados ao BEC demonstraram o genótipo P1/R4, com exceção do isolado Sa22 (pulsotipo 3, cluster A) e Sa73 (pulsotipo 11, cluster B) que exibiram o genótipo P1/R2 e P1/R3, respectivamente (Figura 33 e Tabela 10). Os isolados variaram quanto à presença de genes toxigênicos (Tabela 10).

Dos 11 isolados MRSA classificados como SCC*mec*IV, 09 foram agrupados no cluster C de acordo com os padrões de PFGE exibidos e 02 (Sa30 e Sa33) foram agrupados no cluster D, juntamente com o padrão USA800 (PC, ST5-SCC*mec*IV) utilizado na análise. Os isolados dos clusters C e D foram relacionados ao clone pediátrico, visto que comportam SCC*mec*IV-ST5 (*spa* tipos relacionados: t002, t267 e t6787), embora apenas o cluster D tenha agrupado o padrão USA800 (Figura 33 e Tabela 10). De acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (1995), de um modo geral os isolados do cluster C apresentaram uma diferença de apenas 03 fragmentos em relação

ao padrão USA800, sendo considerados, dessa forma, intimamente relacionados ao padrão (Figura 33).

Apenas um dos isolados presentes no cluster C (Sa1) não exibiu o ST5, porém comportou o novo tipo de sequência descrito no presente estudo, ST2381, que é similar ao ST5 e pertence ao CC5 como mencionado. Os isolados agrupados nos clusters C e D foram observados com maior frequência nos pacientes oriundos da enfermaria do hospital 1 (Figura 33 e Tabela 10). Todos os isolados relacionados ao clone pediátrico demonstraram o genótipo P2/R1 e comportaram o cluster *egc* completo, assim como outras toxinas, com exceção de dois isolados (Sa1 e Sa76) que comportaram apenas parte do cluster *egc*. É importante ressaltar que o Sa82, relacionado ao clone pediátrico, comportou o gene *tst*, um dos principais responsáveis pela Síndrome do Choque Tóxico como previamente referido (Tabela 10).

O isolado MRSA Sa81 (pulsotipo 25), proveniente de um paciente da emergência cardiológica do hospital 3, obtido de amostra sanguínea, foi classificado como SCCmecII-ST105, t002 e pertence aos mesmos complexos clonais dos isolados ST5 (CC5 e *spaCC_002*), quando analisado pelos algoritmos BURST e BURP, respectivamente. O ST105 difere do ST5 por uma única base (Polimorfismo de nucleotídeo único, SNP) no gene *yqiL*. O Sa81 apresentou um padrão de PFGE similar ao padrão USA100 (SCCmecII-ST5; clone Nova York/Japão) no dendrograma, exibindo 96% de coeficiente de similaridade (Figura 33 e Tabela 10).

O ST105 apresenta apenas cinco descrições no banco de dados do MLST. Este tipo de sequência multilocus foi observado apenas em um isolado na cidade de São Paulo em 2007, na Suíça em 1999, 2003 e 2006 e nos EUA em 1998. Este isolado exibiu o genótipo P2/R1, da mesma forma que os isolados relacionados ao clone pediátrico

(SCC*mecIV*-ST5) (Figura 33 e Tabela 10), além de apresentar o cluster *egc* completo em associação aos genes *seh*, *sej* e *sek* (Tabela 10).

É importante ressaltar que foram observados perfis idênticos e intimamente relacionados nos setores do hospital 1 e isolados intimamente relacionados entre os isolados do hospital 1 e os isolados do hospital 2 na análise dos isolados MRSA. O isolado Sa86 (hospital 2, pulsotipo 12), apresentou mais de 95% de similaridade no dendrograma com o isolado Sa73 (hospital 1, pulsotipo 11), ambos MRSA relacionados ao clone BEC e agrupados no cluster B. O isolado MRSA Sa82 (hospital 2, pulsotipo 19) demonstrou mais de 85% de similaridade com os isolados MRSA Sa1 e Sa76 (hospital 1, pulsotipos 18), agrupados no cluster C e relacionados ao clone pediátrico (USA800) (Figura 33).

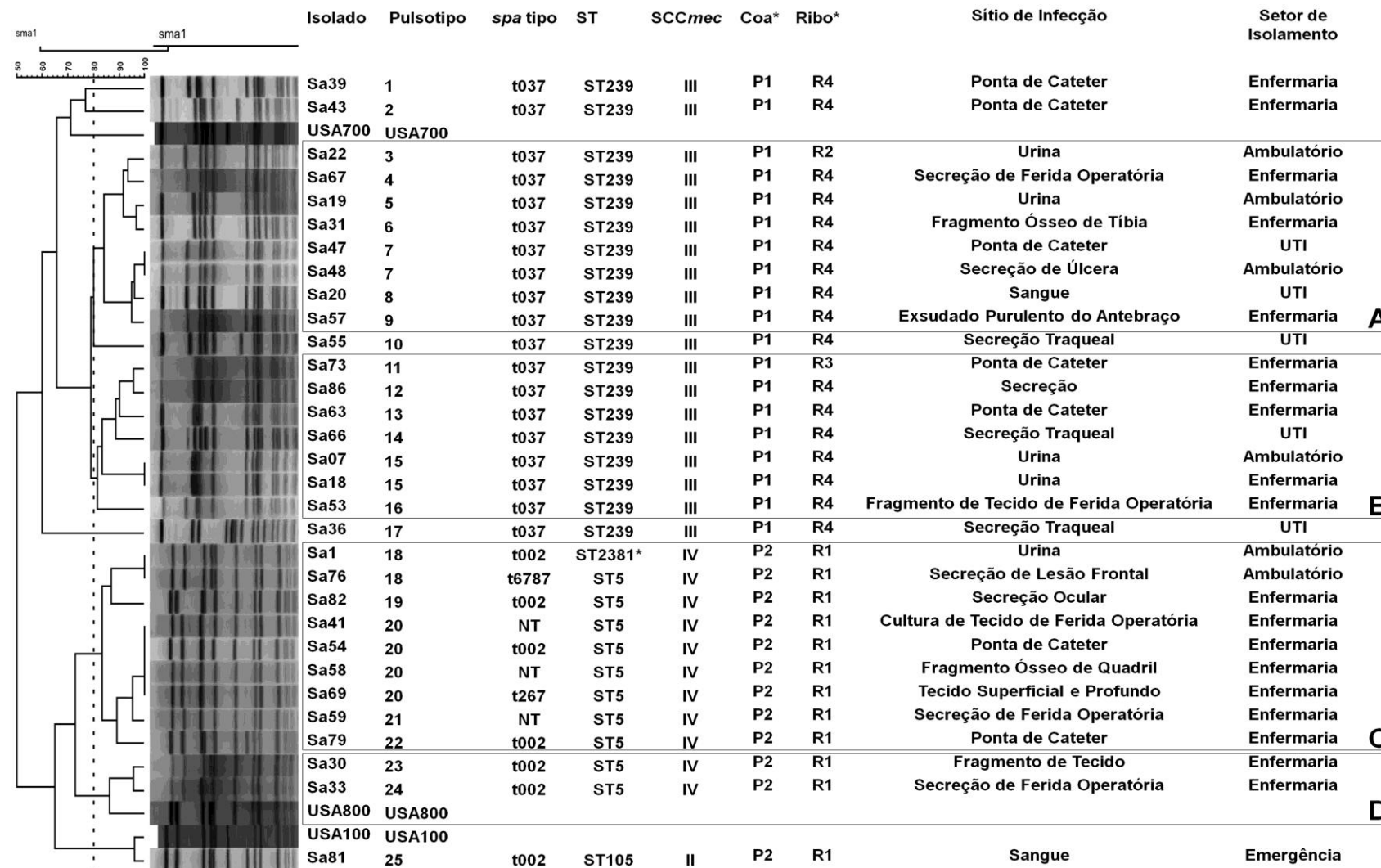


Figura 33. Dendrograma gerado pela análise do PFGE de 31 isolados MRSA e cepas de referência. NT= isolado não tipado; ST2381*= novo ST descrito no estudo; Coa*=Coagulotipo; Ribo*=Ribotipo.

Considerando os isolados MSSA (incluindo os OS-MRSA), 06 isolados foram agrupados no cluster E pelo método de PFGE, sendo relacionados ao padrão USA400 (ST1-SCCmecIV), um clone epidêmico proveniente dos Estados Unidos. Destes, 03 isolados (Sa26, Sa27 e Sa16) comportaram ST1 (t127, P1/R7), 02 isolados (Sa44 e Sa49) comportaram ST97 (t521, P4/R9 e t267, P4/R2, respectivamente) e apenas 01 (Sa72) comportou ST669 (t359, P4/R2) (Figura 34 e Tabela 10).

O ST97 (perfil alélico 3-1-1-1-1-5-3) é similar ao ST669 (3-1-94-1-29-5-3), diferindo em apenas dois alelos (genes *glpF* e *pta*). Estes tipos de sequência multilocus diferem do ST1 (1-1-1-1-1-1-1) em três e cinco alelos, respectivamente e, portanto, não podem ser agrupados no mesmo complexo clonal, visto que um CC é definido quando seis dos setes genes *housekeeping* apresentam o mesmo perfil alélico. O ST669 apresenta apenas duas descrições no banco de dados do MLST, proveniente de isolados de *S. aureus* oriundos de Cabo Verde e Gâmbia. Os isolados do cluster E foram observados nos isolados presentes nos pacientes do ambulatório e da enfermaria do hospital 1 e variaram quanto à presença de genes toxigênicos (Tabela 10).

Três isolados MSSA apresentaram perfil genotípico similar aos isolados agrupados no cluster E (Sa10 e Sa25 [ST1, P1/R7] e Sa78 [ST97, P4/R2]) (Figura 34 e Tabela 10), porém não foram agrupados juntos no dendrograma, visto que exibiram perfis de PFGE distintos do padrão USA400 e dos isolados agrupados no cluster (Figura 34).

Os 08 isolados agrupados no cluster F exibiram um perfil de PFGE similar ao padrão USA800 (clone pediátrico). Destes, 03 isolados foram classificados como ST5 (t002/t214/t1277), 02 isolados como ST5, comportando o novo *spa* tipo descrito no estudo (t10548) e 03 isolados exibiram o ST1635 (t002), que apresenta diferença do ST5 apenas no gene *aroE* e portanto pertencem ao mesmo complexo clonal (CC5). O ST1635 contém

apenas uma descrição no banco de dados público do MLST, proveniente de um isolado da Noruega. Todos os isolados do cluster F exibiram os tipos P2/R1, com exceção do isolado Sa28 (P2/R9) (Figura 34) e todos os isolados comportaram o cluster *egc* completo, associado a outras toxinas, exceto Sa28 e Sa51 que comportaram apenas parte do cluster *egc* (Tabela 10).

Adicionalmente, é importante ressaltar que o isolado Sa87, proveniente de secreção traqueal de um paciente da UTI do hospital 2, classificado como OS-MRSA, foi agrupado no cluster F, sendo, portanto, relacionado ao clone pediátrico (Figura 34 e Tabela 10). Este foi o isolado que comportou mais genes toxigênicos no estudo, incluindo o gene *tst* (Tabela 10).

Seis isolados MSSA apresentaram perfil genotípico similar aos isolados agrupados no cluster F (Sa5, 11, 21, 40, 56 e 80 [ST5, P2/R1]), contudo não foram agrupados juntos no dendrograma, visto que exibiram perfis de PFGE distintos do padrão USA800 e dos isolados agrupados no cluster (Figura 34 e Tabela 10). Outros clones internacionais, diferentes do clone USA800, também comportam o ST5 associado a diferentes tipos de *SCCmec*, como no caso do clone NY/J (USA100, ST5-*SCCmecII*). No dendrograma, o Sa21 demonstrou perfil de PFGE mais similar ao padrão USA100 do que ao padrão USA800 (Figura 34).

Todos os isolados classificados como ST333 (associados aos t084 e t279) e um isolado ST15 (Sa38, *spa* não-tipado) foram agrupados juntos no cluster G. Nenhum dos isolados foi relacionado a clones internacionais, demonstrando apenas uma similaridade de 74,4% com o padrão USA900 (ST15-*SCCmecIV*) (Figura 34). O ST333 é bastante similar ao ST15, diferindo em apenas um alelo (gene *arcC*) e, portanto, pertencem ao mesmo complexo clonal, denominado neste estudo de CCb. O ST333 apresenta uma

única descrição no banco de dados do MLST, proveniente de um *S. aureus* presente em um paciente hospitalar do sudeste do Brasil, oriundo de amostra de sangue e isolado em 2000. Os isolados do cluster G exibiram o genótipo P1/R4, exceto Sa77 (P1/R3) e Sa83 (P1/R12) (Figura 34 e Tabela 10). É importante ressaltar que o isolado Sa17 (OS-MRSA), agrupado neste cluster, comportou o gene *eta*, um dos principais genes responsáveis pela Síndrome da Pele Escaldada como mencionado anteriormente (Tabela 10).

O cluster H agrupou todos os isolados ST30 (t318/t021/t1001/t433) e um singleton ST285 (t021) e foram relacionados ao clone OSPC (USA1100, ST30-SCCmecIV) (Figura 34 e Tabela 10), descrito previamente no Brasil. No dendrograma, os isolados exibiram 76,9% de similaridade com o padrão USA1100 utilizado para a análise (Figura 34), porém quando comparados individualmente com o padrão em um novo dendrograma, a maioria dos isolados exibiu similaridade superior ou igual a 80%.

O ST285 é bastante similar ao ST30, diferindo deste em apenas um alelo (gene *gmk*) e, desta forma, pertencem ao mesmo complexo clonal, denominado neste estudo de CCa. O ST285 também apresenta apenas uma descrição no banco de dados do MLST, sendo proveniente de um isolado de *S. aureus* dos EUA. Todos os isolados exibiram o genótipo P2/R2, exceto Sa35, Sa42 e Sa50 (P2/R3) e Sa65 (P1/R3) (Figura 34 e Tabela 10). Todos os isolados do cluster H comportaram o cluster *egc* completo, assim como outras toxinas (Tabela 10).

Dois isolados foram individualmente relacionados a clones epidêmicos através da análise do dendrograma gerado pelo método de PFGE. O isolado OS-MRSA Sa03 (pulsotipo 38, ST5/t2164, CC5, P2/R1), proveniente de um paciente ambulatorial do hospital 1, obtido de secreção vaginal, apresenta 84,6% de similaridade com o padrão

USA100 (clone Nova Iorque/Japão) (Figura 34 e Tabela 10) e comportou os genes toxigênicos *sec*, *seg*, *sek*, *sel* e *seo* (Tabela 10).

O isolado Sa32 (pulsotipo 61, ST45/t1646, CC45, P2/R10), proveniente de uma paciente da enfermaria do hospital 1, oriundo de ponta de cateter, apresenta similaridade de aproximadamente 95% com o padrão USA600 (clone Berlim, ST45-SCC*mecIV*) (Figura 34 e Tabela 10). Este isolado comportou o cluster *egc* completo, associado à *sec*, *sel* e *tst* (Tabela 10). Dois isolados MSSA (Sa84 [ST45, t065, P2/R13] e Sa08 [ST97, t10550, P2/R5]) apresentaram perfil de PFGE com mais 75% de similaridade com o padrão USA600 no dendrograma. O Sa84 apresenta menos de 06 fragmentos de diferença comparado ao padrão USA600 (BC) e, de acordo os critérios de Tenover e colaboradores (1995), seria classificado como possivelmente relacionado ao mesmo. O isolado Sa08 apresenta menos de 03 fragmentos de diferença do padrão USA600 e seria classificado como intimamente relacionado ao clone clone Berlim de acordo com os mesmo critérios (Figura 34).

Apenas dois isolados (Sa74, pulsotipo 68 e Sa75, pulsotipo 69), obtidos de secreção de cateter e sangue, provenientes da enfermaria do hospital 1, respectivamente, comportaram o ST718 e não foram agrupados em clusters (Figura 34). Este tipo de sequência multilocus apresenta uma única descrição do banco de dados do MLST e foi observado em um isolado de *S. aureus* proveniente de um paciente presente na cidade de São Paulo/Brasil. A bactéria isolada em 2005, oriunda de amostra de sangue, foi responsável pela sepse clínica do paciente.

Os isolados Sa37 (pulsotipo 57) e Sa52 (pulsotipo 58, OS-MRSA) foram agrupados juntos no dendrograma e ambos comportaram ST239, t037 e P1/R4, em conformidade com os isolados MRSA relacionados ao clone BEC (Figura 34).

No presente estudo, apenas 03 isolados não puderam ser tipados pelo PFGE, Sa4 (ST não-tipado/t10550), Sa9 (ST não-tipado/t037) e Sa45 (ST398/t1451), pois não apresentaram padrões de banda após restrição com a enzima *Sma*I.

Foram observados perfis idênticos e intimamente relacionados na análise dos isolados MSSA (incluindo os OS-MRSA) nos setores do hospital 1 e isolados intimamente relacionados entre os isolados do hospital 1 e hospitais 2 e 3 (Figura 34).

O isolado MSSA Sa85 (hospital 3, pulsotipo 29) apresentou mais de 80% de similaridade no dendrograma com os isolados Sa 24 e Sa25 (hospital 1, pulsotipos 28 e 30 respectivamente). Os isolados do cluster F (Sa12, 23, 51, 29, 13, 28 e 71, hospital 1), relacionados ao clone pediátrico, exibiram mais de 80% de similaridade no dendrograma com o isolado Sa87 (hospital 2, pulsotipo 44). Os isolados Sa17, 60, 77, 06 e 38 (hospital 1), agrupados no cluster G, exibiram cerca de 90% de similaridade com o isolado Sa83 (hospital 3, pulsotipo 52), todos exibindo o ST333 (Figura 34).

O isolado Sa84 (hospital 3, pulsotipo 60), apresentou aproximadamente 85% de similaridade no dendrograma com o isolado Sa08 (hospital 1, pulsotipo 59), ambos ST45. Os isolados agrupados no cluster H (Sa35, 42, e 65 [ST30], hospital 1), exibiram aproximadamente 95% de similaridade com o isolado Sa89 ([ST285], hospital 2, pulsotipo 66) (Figura 34). O ST285 e o ST30 pertencem ao mesmo complexo clonal (CCa) e o ST285 também apresenta apenas uma descrição no banco de dados do MLST, sendo proveniente de um isolado de *S. aureus* dos EUA como mencionado anteriormente.

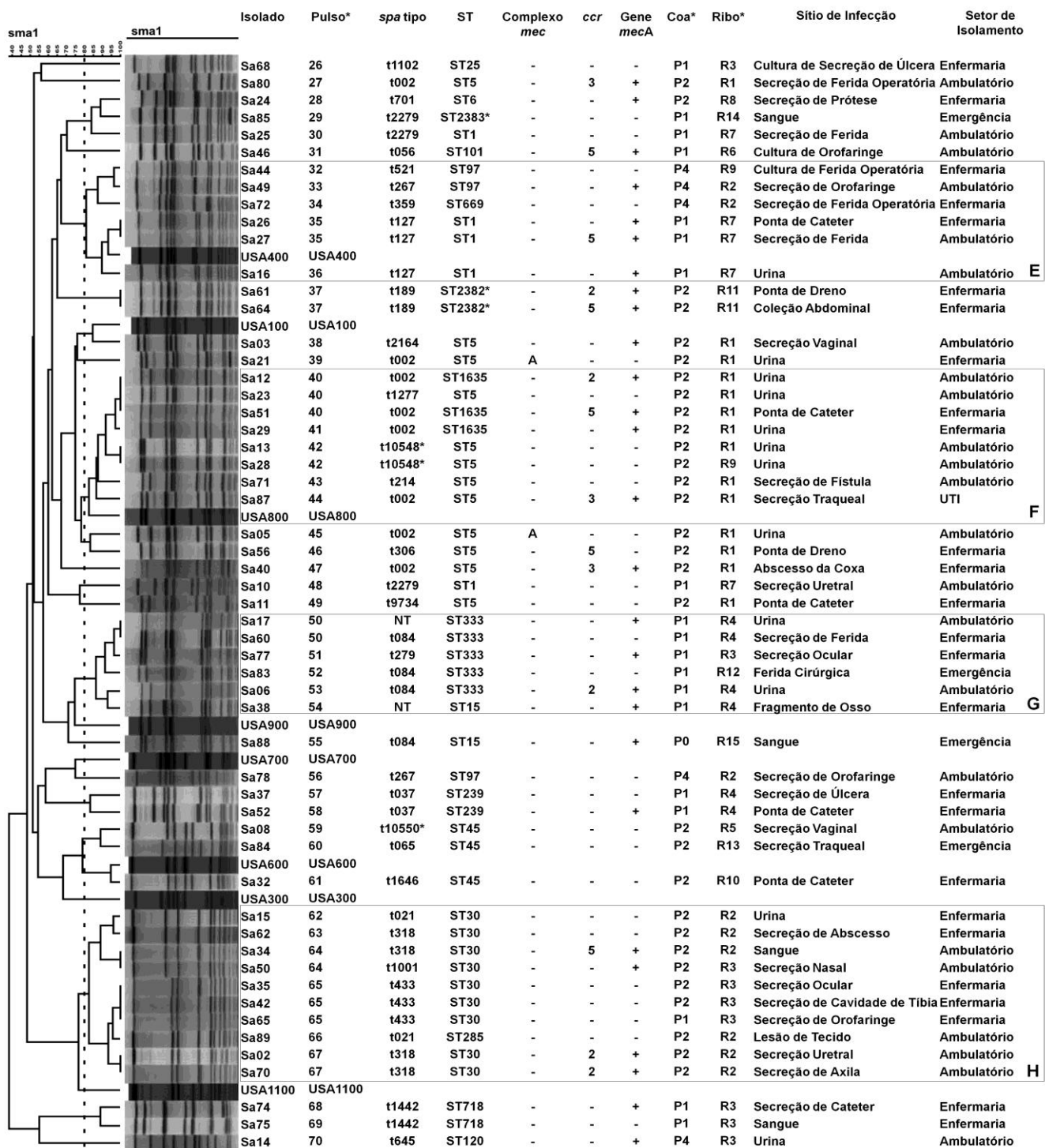


Figura 34. Dendrograma gerado pela análise do PFGE de 55 isolados MSSA (incluindo os OS-MRSA) e cepas de referência. NT= isolado não tipado. ST2382* e ST2383*= novos ST's descritos no estudo; t10548* e t10550*= novos *spa* tipos descritos no estudo; Pulso*=Pulsotipo; Coa*=Coagulotipo; Ribo*=Ribotipo. Três isolados classificados como OS-MRSA (Sa4, Sa9 e Sa45) não fazem parte do dendrograma, pois não foram tipados pelo PFGE.

Tabela 10. Caracterização de *S. aureus* isolados de amostras clínicas

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Setor de Isolamento no Hospital	Perfil Coa*	Perfil Ribo*	ST's	<i>spa</i> tipos	<i>ccr</i>	<i>mec</i>	Gene <i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	CEF/OXA*	Exotoxinas	Clone Relacionado
Sa81	Sangue	Emergência	P2	R1	ST105	t002	2	A	+	II	R	<i>egc</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> + <i>sek</i>	NY/J(USA100)
Sa22	Urina	Ambulatório	P1	R2	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>seg</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	BEC
Sa67	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa19	Urina	Ambulatório	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>seg</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	BEC
Sa31	Fragmento Ósseo de Tibia	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa47	Ponta de Cateter	UTI	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa48	Secreção de Úlcera	Ambulatório	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i>	BEC
Sa20	Sangue	UTI	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>sek</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	BEC
Sa57	Exsudado Purulento do Antebraço	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> + <i>sek</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i>	BEC
Sa55	Secreção Traqueal	UTI	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> + <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i>	BEC
Sa73	Ponta de Cateter	Enfermaria	P1	R3	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>seg</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>seo</i>	BEC
Sa86	Secreção	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>sea</i> ⁺ <i>seg</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	BEC
Sa63	Ponta de Cateter	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa66	Secreção Traqueal	UTI	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i>	BEC

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Setor de Isolamento no Hospital	Perfil Coa*	Perfil Ribo*	ST's	<i>spa</i> tipos	<i>ccr</i>	<i>mec</i>	Gene <i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	CEF/OXA*	Exotoxinas	Clone Relacionado
Sa07	Urina	Ambulatório	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa18	Urina	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	BEC
Sa53	Fragmento de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺	BEC
Sa36	Secreção Traqueal	UTI	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa39	Ponta de Cateter	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	BEC
Sa43	Ponta de Cateter	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037	3	A	+	III	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i>	BEC
Sa01	Urina	Ambulatório	P2	R1	ST2381*	t002	2	B	+	IV	R	<i>seg</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>seo</i>	PC (USA800)
Sa76	Secreção de Lesão Frontal	Ambulatório	P2	R1	ST5	t6787	2	B	+	IV	R	<i>seg</i> + <i>sei</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i> + <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i>	PC (USA800)
Sa82	Secreção Ocular	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> + <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>tst</i>	PC (USA800)
Sa41	Cultura de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	P2	R1	ST5	NT	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i>	PC (USA800)
Sa54	Ponta de Cateter	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	PC (USA800)
Sa58	Fragmento Ósseo de Quadril	Enfermaria	P2	R1	ST5	NT	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	PC (USA800)
Sa59	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	P2	R1	ST5	NT	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	PC (USA800)
Sa69	Tecido Superficial e Profundo	Enfermaria	P2	R1	ST5	t267	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i>	PC (USA800)
Sa79	Ponta de Cateter	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	PC (USA800)
Sa30	Fragmento de Tecido	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	PC (USA800)
Sa33	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002	2	B	+	IV	R	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	PC (USA800)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Setor de Isolamento no Hospital	Perfil Coa*	Perfil Ribo*	ST's	<i>spa</i> tipos	<i>ccr</i>	<i>mec</i>	Gene <i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	CEF/OXA*	Exotoxinas	Clone Relacionado
Sa10	Secreção Uretral	Ambulatório	P1	R7	ST1	t2279					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	
Sa25	Secreção de Ferida	Ambulatório	P1	R7	ST1	t2279					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	
Sa16	Urina	Ambulatório	P1	R7	ST1	t127			+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>seb</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sek</i>	USA400
Sa26	Ponta de Cateter	Enfermaria	P1	R7	ST1	t127			+		S	<i>sea</i> ⁺ <i>seg</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	USA400
Sa27	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	P1	R7	ST1	t127	5		+		S	<i>sea</i> ⁺ <i>seg</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	USA400
Sa44	Cultura de Ferida Operatória	Enfermaria	P4	R9	ST97	t521					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i>	USA400
Sa49	Secreção de Orofaringe	Ambulatório	P4	R2	ST97	t267			+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i>	USA400
Sa78	Nasoorofaringe	Ambulatório	P4	R2	ST97	t267					S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i>	
Sa72	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	P4	R2	ST669	t359					S	<i>seg</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>seo</i>	USA400
Sa89	Lesão de Tecido	Ambulatório	P2	R2	ST285	t021					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)
Sa65	Orofaringe	Enfermaria	P1	R3	ST30	t433					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)
Sa02	Secreção Uretral	Ambulatório	P2	R2	ST30	t318	2		+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)
Sa15	Urina	Enfermaria	P2	R2	ST30	t021					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)
Sa34	Sangue	Ambulatório	P2	R2	ST30	t318	5		+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)
Sa62	Secreção de Abscesso Joelho	Enfermaria	P2	R2	ST30	t318					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Setor de Isolamento no Hospital	Perfil Coa*	Perfil Ribo*	ST's	<i>spa</i> tipos	<i>ccr</i>	<i>mec</i>	Gene <i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	CEF/OXA*	Exotoxinas	Clone Relacionado
Sa70	Secreção de Axila	Ambulatório	P2	R2	ST30	t318	2		+		S	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	OSPC (USA1100)
Sa35	Secreção Ocular	Enfermaria	P2	R3	ST30	t433					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i>	OSPC (USA1100)
Sa50	Secreção Nasal	Ambulatório	P2	R3	ST30	t1001			+		S	<i>egc</i> ⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>sej</i>	OSPC (USA1100)
Sa42	Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia	Enfermaria	P2	R3	ST30	t433					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>sej</i>	OSPC (USA1100)
Sa32	Ponta de Cateter	Enfermaria	P2	R10	ST45	t1646					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sec</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>tst</i>	BC (USA600)
Sa84	Secreção Traqueal	Emergência	P2	R13	ST45	t065					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sec</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> + <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	
Sa08	Secreção Vaginal	Ambulatório	P2	R5	ST45	t10550*					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sec</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>tst</i>	
Sa03	Secreção Vaginal	Ambulatório	P2	R1	ST5	t2164			+		S	<i>sec</i> ⁺ <i>seg</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i> ⁺ <i>seo</i>	NY/J(USA100)
Sa05	Urina	Ambulatório	P2	R1	ST5	t002		A			S	<i>egc</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	
Sa11	Ponta de Cateter	Enfermaria	P2	R1	ST5	t9734					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	
Sa21	Urina	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002		A			S	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	
Sa40	Abscesso da Coxa	Enfermaria	P2	R1	ST5	t002	3		+		S	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	
Sa56	Ponta de Dreno	Enfermaria	P2	R1	ST5	t306	5				S	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	
Sa80	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	P2	R1	ST5	t002	3		+		S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>tst</i>	
Sa13	Urina	Ambulatório	P2	R1	ST5	t10548*					S	<i>egc</i> ⁺ <i>seb</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	PC (USA800)
Sa23	Urina	Ambulatório	P2	R1	ST5	t1277					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sek</i>	PC (USA800)
Sa71	Secreção de Fístula Direita	Ambulatório	P2	R1	ST5	t214					S	<i>egc</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> + <i>sel</i>	PC (USA800)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Sector de Isolamento no Hospital	Perfil Coa*	Perfil Ribo*	ST's	spa tipos	ccr	mec	Gene <i>mecA</i>	SCCmec	CEF/OXA*	Exotoxinas	Clone Relacionado
Sa87	Secreção Traqueal	UTI	P2	R1	ST5	t002	3		+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>tst</i>	PC (USA800)
Sa28	Urina	Ambulatório	P2	R9	ST5	t10548*					S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sen</i>	PC (USA800)
Sa12	Urina	Ambulatório	P2	R1	ST1635	t002	2		+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	PC (USA800)
Sa29	Urina	Enfermaria	P2	R1	ST1635	t002			+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sek</i>	PC (USA800)
Sa51	Ponta de Cateter	Enfermaria	P2	R1	ST1635	t002	5		+		S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i>	PC (USA800)
Sa74	Secreção de Cateter	Enfermaria	P1	R3	ST718	t1442			+		S	<i>seg</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>seo</i>	
Sa75	Sangue	Enfermaria	P1	R3	ST718	t1442					S	<i>seg</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>seo</i>	
Sa61	Ponta de Dreno	Enfermaria	P2	R11	ST2382*	t189	2		+		S	<i>seg</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sen</i> ⁺ <i>seo</i>	
Sa64	Coleção Abdominal	Enfermaria	P2	R11	ST2382*	t189	5		+		S	<i>egc</i> [*]	
Sa37	Secreção de Úlcera	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i>	
Sa52	Ponta de Cateter	Enfermaria	P1	R4	ST239	t037			+		S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>sen</i>	
Sa83	Ferida Operatória	Emergência	P1	R12	ST333	t084					S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sea</i> ⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	
Sa77	Secreção Ocular	Enfermaria	P1	R3	ST333	t279			+		S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>sem</i>	
Sa06	Urina	Ambulatório	P1	R4	ST333	t084	2		+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i>	
Sa17	Urina	Ambulatório	P1	R4	ST333	NT			+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>eta</i>	
Sa60	Secreção de Ferida (Transplante)	Enfermaria	P1	R4	ST333	t084					S	<i>seg</i> ⁺ <i>sei</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sem</i> ⁺ <i>seo</i>	
Sa88	Sangue	Emergência	P0	R15	ST15	t084			+		S	<i>egc</i> ⁺⁺ <i>seh</i> ⁺ <i>sej</i> ⁺ <i>sek</i> ⁺ <i>sel</i> ⁺ <i>tst</i>	

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Sector de Isolamento no Hospital	Perfil Coa*	Perfil Ribo*	ST's	<i>spa</i> tipos	<i>ccr</i>	<i>mec</i>	Gene <i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	CEF/OXA*	Exotoxinas	Clone Relacionado
Sa38	Fragmento Ósseo	Enfermaria	P1	R4	ST15	NT			+		S	<i>seg+ sej+ sek+ sel+ sem+ sen+ seo</i>	
Sa04	Urina	Ambulatório	P2	R3	NT	t10550*	2		+		S	<i>seg+ seh+ sej+ sek+ sel+ seo</i>	
Sa45	Secreção de Dreno Torácico	Enfermaria	P3	R4	ST398	t1451	2		+		S	<i>egc*+ sej</i>	
Sa46	Cultura de Orofaringe	Ambulatório	P1	R6	ST101	t056	5		+		S	<i>egc*+ sej</i>	
Sa24	Secreção de Prótese	Enfermaria	P2	R8	ST6	t701			+		S	<i>egc*+ sea+ sek</i>	
Sa14	Urina	Ambulatório	P4	R3	ST120	t645			+		S	<i>egc*+ seb+ sek+ sel</i>	
Sa09	Esperma	Ambulatório	P2	R6	NT	t037			+		S	<i>seg+ sei+ sej+ sek+ sel+ sem+ seo</i>	
Sa68	Cultura de Secreção de Úlcera	Enfermaria	P1	R3	ST25	t1102					S	<i>egc*+ seb+ sej+ sek</i>	
Sa85	Sangue	Emergência	P1	R14	ST2383*	t2279					S	<i>egc*+ sea+ seh+ sej+ sek + sel</i>	

Perfil Coa*= Coagulotipo; Perfil Ribo*= Ribotipo; CEF/OXA*= Susceptibilidade à Cefoxitina/Oxacilina; *egc**= cluster *egc* completo (*seg+sei+sem+sen+seo*); NT= isolado não tipado. ST2381*, ST2382* e ST2383*= novos ST's descritos no estudo; t10548* e t10550*= novos *spa* tipos descritos no estudo.

6. Discussão

No presente estudo, a frequência de isolados clínicos de *S. aureus* comportando os genes que codificam as toxinas SEG-SEO foi bastante elevada. Estas enterotoxinas apresentam atividade superantigênica e algumas demonstram comprovada atividade emética, como SEG, SEH e SEI (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). Adicionalmente, os genes das enterotoxinas foram observados nos *S. aureus* isolados em todos os principais sítios de infecção.

A presença de apenas um dos genes toxigênicos componente do cluster *egc* já demonstra a presença do mesmo. Este, quando se encontra presente nos isolados, frequentemente comporta todos os genes que o compõe, porém a ausência de alguns genes do cluster em *S. aureus* pode ocorrer devido a mutações nos genes, resultando em genes variantes, que dificultam o pareamento dos *primers* (BLAIOTTA et al., 2006). No nosso estudo, 63 (71%) isolados de *S. aureus* comportaram o cluster *egc* completo e revelaram 25 genótipos distintos quando comparamos a presença do cluster *egc* completo com as todas as exotoxinas analisadas.

Em diversos estudos são observados diferentes percentuais de genes toxigênicos presentes em *S. aureus* isolados de pacientes em diversos países (OMOE et al., 2002; ROSEC; GIGAUD, 2002; BANIA et al., 2006; VARSHNEY et al., 2009; SOUZA et al., 2009; XIE et al., 2011). Ainda, a presença de mais de um gene toxigênico em um isolado de *S.*

aureus pode favorecer a sua patogenicidade e manutenção no hospedeiro (RALL et al., 2010).

O gene *eta* foi verificado em apenas um isolado (hospital 1), procedente de urina, em um paciente ambulatorial. Os baixos índices de isolados portadores dos genes *eta* e *etb* estão em conformidade com outras investigações, que demonstraram a baixa frequência de *S. aureus* portadores destes genes em diferentes regiões do mundo (JOHNSON et al., 1991; BECKER et al., 1998; BECKER et al., 2003; XIE et al., 2011).

O gene *tst* foi observado em seis isolados, dos quais um isolado MRSA (Sa82) e um MSSA (Sa87) foram relacionados ao clone pediátrico USA800, um isolado MSSA (Sa32) foi relacionado ao clone USA600 e três isolados MSSA (Sa08, Sa80 e Sa88) exibiram o genótipo P2/R5-ST45-t10550, P2/R1-ST5-t002 e P0/R15-ST15-t084, respectivamente. Estes isolados foram provenientes de diversos sítios de infecção. Este é um dado relevante, visto que a Síndrome do Choque Tóxico foi inicialmente relacionada ao uso de tampões hiperabsorventes por mulheres portadoras de *S. aureus* provenientes de secreção vaginal e produtores de *tst*, porém, na atualidade, os casos não menstruais da TSS na comunidade e em hospitais são predominantes (FITZGERALD et al., 2001; DURAND et al., 2006).

Em relação às SEs, tanto os isolados MRSA quanto os MSSA apresentaram uma grande diversidade genética e comportaram vários genes toxigênicos. *S. aureus* enterotoxigênico representa um risco para a saúde pública, uma vez que esta bactéria é frequentemente envolvida em doenças de origem comunitária e hospitalar. É importante ressaltar que a maioria dos casos de diarreia associada ao uso de antibióticos é relacionada a isolados nosocomiais MRSA (SCHMITZ et al., 1997; BOYCE; HAVILL, 2005) e, no nosso

estudo, a frequência de isolados MRSA portador de genes toxigênicos nos hospitais foi expressiva.

A aplicação de técnicas moleculares na detecção das exotoxinas estafilocócicas é um passo relevante para se caracterizar rapidamente estas toxinas, além de gerar informações que podem contribuir para o conhecimento e controle das doenças relacionadas a este patógeno.

No Brasil, poucos estudos relatam a frequência de genes toxigênicos em *S. aureus*, especialmente em isolados de amostras clínicas. Em um estudo realizado por Tortora e colaboradores (1996), 46 isolados de *S. aureus* foram obtidos de pacientes internados em um grande hospital público da cidade do Rio de Janeiro, dos quais 14 expressaram uma ou mais enterotoxinas. A enterotoxina D (SED) foi a mais frequentemente observada.

Em Botucatu/SP, Rall e colaboradores (2010) examinaram as mãos e as narinas de 82 manipuladores de alimentos e isolaram 20 estafilococos coagulase positivos. Destes isolados, dezenove foram positivos para um ou mais genes toxigênicos e o gene mais frequentemente amplificado foi *sea*, seguido de *seh* e *sei*.

Vasconcelos e colaboradores (2011) estudaram 90 isolados de *S. aureus* oriundos de amostras clínicas de recém-nascidos no estado de São Paulo. Foram investigados os genes das enterotoxinas SEE, SEG, SEH e SEI, onde um ou mais genes toxigênicos foram observados em 54 isolados. O estudo revelou também a expressão de SEG, SEH e/ou SEI em 32 isolados.

Miranda e colaboradores (2007) realizaram um estudo em um hospital do Recife e descreveram a presença de isolados enterotoxigênicos relacionados ao clone internacional USA800, onde todos foram portadores do cluster *egc*. Dos isolados analisados apenas um comportou a presença do gene *sec* em associação à presença do cluster *egc*. Nenhum isolado relacionado ao clone epidêmico Brasileiro (BEC) comportou genes toxigênicos.

No nosso estudo, os isolados MRSA relacionados ao clone BEC foram os mais observados (61%). O clone BEC representa uma linhagem resistente a múltiplos antibióticos e é o HA-MRSA predominante no país, como já mencionado (TEIXEIRA et al., 1995; MIRANDA et al., 2007).

O clone demonstra algumas características que podem fornecer uma grande capacidade de disseminação mundial, como maior habilidade em produzir biofilme, aderir e invadir células epiteliais das vias aéreas (AMARAL et al., 2005). Este é responsável por um grande número de infecções HA-MRSA em outros países da América do Sul e em outros continentes (de SOUSA et al., 2005; DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008). Isolados BEC têm se disseminado no Brasil por mais de uma década e estudos prévios demonstraram um tipo clonal com predominância de 70-80% em relação a todos os subtipos BEC descritos (TEIXEIRA et al., 1995, MELO et al., 2004; AMARAL et al., 2005). No entanto, Sousa-Junior e colaboradores (2009) descreveram 16 subtipos de isolados BEC na análise dos padrões de PFGE e, de acordo com os resultados, pequenas variações genômicas podem ter ocorrido, resultando em variantes BEC bem adaptadas que causam infecções hospitalares graves.

Nós observamos uma grande variabilidade dos padrões de PFGE dos isolados BEC, reforçando a observação de que pequenas variações no genoma dos isolados BEC vêm

ocorrendo ao longo do tempo. De acordo com Miranda e colaboradores (2007), o BEC também foi a cepa MRSA mais comumente observada no hospital 1, durante 2002-2003, representando c.70% dos isolados MRSA analisados. O estudo também revelou que 14% (6/43) das cepas MRSA foram relacionadas ao clone USA800 (clone pediátrico). Apesar da predominância de isolados BEC, vários estudos têm descrito um aumento da incidência de isolados CA-MRSA (SCC*mecIV*), ainda não totalmente caracterizados e com baixa resistência antimicrobiana, assim como isolados relacionados ao USA800 nos hospitais do Brasil (TRINDADE et al., 2005; MIRANDA et al., 2007; SCHUENCK et al., 2009; SCRIBEL et al., 2009).

Foi possível observar uma frequência elevada de isolados relacionados ao USA800 no nosso estudo. Todos os isolados MRSA que carregaram o SCC*mecIV* (c.35%, 11/31) foram considerados relacionados ao clone epidêmico USA800, portador do cluster *egc* completo em sua maioria, sendo o segundo clone mais frequente entre os isolados MRSA encontrados. Estes isolados foram, em geral, mais homogêneos do que os isolados BEC pela análise do PFGE. Nós também observamos vários isolados MSSA relacionados ao clone USA800 relacionados a infecções graves em pacientes hospitalizados.

Alguns autores relatam que isolados MRSA SCC*mecIV*, de diferentes linhagens, podem carrear fatores de virulência específicos como a presença de cluster *egc*, toxina *pvl*, produção de biofilme e/ou genes de resistência (MIRANDA et al., 2007; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; MCCARTHY; LINDSAY, 2010; SOLA et al., 2012). Desta forma, Os isolados USA800 parecem comportar características específicas que proporcionam à bactéria habilidade de disseminação e promove sua emergência como importante patógeno em ambientes hospitalares em todo o mundo. Os isolados relacionados ao clone pediátrico

parecem conservar peculiaridades que resultam em uma maior homogeneidade dos isolados e podem ser responsáveis por sua manutenção no ambiente hospitalar.

As amostras do clone pediátrico foram inicialmente identificadas em 1992 por pesquisadores de Portugal e receberam esta denominação por terem sido isolados de instituições pediátricas (SÁ-LEÃO et al., 1999). No Brasil, a presença deste clone tem sido relatada em pacientes provenientes de hospitais e profissionais da saúde de atendimento médico domiciliar na cidade do Rio de Janeiro, relacionado à colonização e não à infecção dos portadores, assim como em Recife (MELO et al., 2004; ROZENBAUM et al., 2006; DE MIRANDA et al., 2007).

Adicionalmente, descrevemos no estudo um isolado MRSA relacionado ao clone Nova Iorque/Japão (USA100), oriundo de um paciente da emergência cardiológica do hospital 3, proveniente de amostra de sangue. Alguns estudos no Brasil têm relatado a presença de cepas relacionadas ao clone USA100 por PFGE que comportam ST5 quando analisados pelo MLST (MELO et al., 2004; MIRANDA et al., 2007; SILVA-CARVALHO et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2012). No entanto, este é o primeiro relato de isolado MRSA SCCmecII carreando ST105/t002 e relacionado com o clone USA100 em um hospital na região Nordeste. Um resultado semelhante foi relatado por Carmo e colaboradores (2011), que descreveram um único isolado MRSA SCCmecII transportando ST105 em São Paulo. Isto poderia indicar que este isolado, presente na região Nordeste, deriva do clone Nova Iorque/Japão e pode estar difundido em outras regiões do país.

O clone Nova Iorque/Japão foi inicialmente identificado como uma linhagem dominante de MRSA em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque e algumas localidades adjacentes, assim como em um hospital em Tóquio, Japão (ROBERTS et al.,

1998). A primeira descrição de um isolado MRSA similar ao clone NY/J no Brasil foi descrito em um paciente de um hospital do Rio de Janeiro (MELO et al., 2004; DE MIRANDA et al., 2007)

Em relação aos isolados susceptíveis à meticilina, poucos estudos relataram a presença de determinantes de resistência em isolados MSSA, que pode ocorrer por excisão parcial do *SCCmec* em isolados MRSA ou por integração parcial do cassete cromossômico em isolados MSSA, resultando em isolados sensíveis que podem comportar um grande número de segmentos do *SCCmec* (CORKILL et al., 2004; HULETSKY et al., 2004; RUPP et al., 2006; DONNIO et al., 2007; SHORE et al., 2008; SHARFF et al., 2012).

Deurenberg e Stobberingh (2008) descreveram que a transferência do *SCCmec* para uma linhagem MSSA, portadora de um genótipo específico, possivelmente originou clones MRSA bem sucedidos como, por exemplo, os que fazem parte dos complexos clonais CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45. Assim, isolados MSSA e MRSA podem apresentar genótipos relacionados, que conservam as mesmas características de virulência. Estes podem persistir ao mesmo tempo no ambiente hospitalar e podem ser responsáveis por infecções nosocomiais.

Em nosso estudo foi possível observar uma quantidade considerável de isolados MSSA que carregavam o gene *mecA*, com ou sem a presença de outros elementos do *SCCmec*, sendo considerados então isolados OS-MRSA. Segundo o CLSI (2012), os isolados de estafilococos que comportam o gene *mecA*, ou que produzem PBP2a, devem ser reportados como resistentes à oxacilina/meticilina. Oliveira e Lencastre (2011), sugerem fortemente que o controle transcricional do gene *mecA* também pode ser realizado direta ou indiretamente por outros determinantes ainda não identificados (diferentes do sistema *mecI*-

mecR1 do complexo *mec*) e pode afetar, como resultado, a expressão fenotípica da resistência à β -lactâmicos.

Essas descobertas parecem ser um novo desafio para a clínica médica, pois pode levar a um tratamento inadequado do paciente. Para o nosso conhecimento, esta é a primeira descrição de isolados MSSA em hospitais que carregam o gene *mecA* e/ou outros segmentos do SCC*mec* no Brasil.

Os nossos dados revelaram diversos isolados MSSA relacionados a clones epidêmicos como os CA-MRSA USA400 (cluster E) e USA1100 (cluster H), bem como os clones HA-MRSA USA800 (cluster F), USA100 (SA03) e USA600 (SA32). Os isolados CA-MRSA estão se tornando comuns em ambientes hospitalares no mundo inteiro, sendo responsáveis por infecções nosocomiais (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009). Além disso, de um modo geral, eles são considerados mais virulentos do que os HA-MRSA, devido à existência de diversos fatores de virulência (CHAMBERS, 2001; ETIENNE, 2005). Na nossa análise, todos os isolados relacionados ao clone OSPC (USA1100) comportaram o cluster *egc* completo.

O clone OSPC, observado pela primeira vez na Austrália e na Nova Zelândia, associado a isolados CA-MRSA, foi descrito pela primeira vez no Brasil em 2005 (MILLAR et al., 2007; RIBEIRO et al., 2005) e, desde então, tem sido descrito em hospitais no Brasil, bem como o USA400, acarretando vários tipos de problemas médicos (NIMMO; COOMBS et al., 2008; SCRIBEL et al., 2009; SILVA-CARVALHO et al., 2009; SCHUENCK et al., 2012; BELTRAME et al., 2012).

Donabedian e colaboradores (2009) descreveram que o clone HA-MRSA USA600 (BC), capaz de ampla disseminação global, pode ter características de virulência únicas, devido aos relatos de alta taxa de mortalidade de pacientes com infecções na corrente sanguínea causadas por isolados MRSA relacionados a este clone (SIMOR et al., 2002; TENOVER et al., 2008; WANNET et al., 2004; WITTE et al., 1997). No entanto, a ocorrência de infecções relacionadas ao USA600 continua escassa no Brasil (SILVA-CARVALHO et al., 2009; BELTRAME et al., 2012).

A aplicação das técnicas de tipagem molecular tornou possível observar diversos clones e isolados intimamente relacionados, associados ou não a clones epidêmicos, entre os diferentes setores do hospital 1 e entre este e os outros hospitais analisados, sugerindo uma dispersão dos isolados no ambiente hospitalar, podendo ser responsáveis por infecções nosocomiais na região.

Embora os métodos de tipagem baseados na análise do genoma completo das bactérias ou que envolvem o sequenciamento de genes polimórficos/housekeeping tenham um maior poder discriminatório e permitam a identificação de clones epidêmicos, a associação das técnicas de ribotipagem-PCR e polimorfismo do gene da coagulase foi satisfatória, pois permitiu agrupar e diferenciar os isolados de *S.aureus* estudados, assim como acompanhar a dispersão dos isolados no ambiente hospitalar. Foi possível observar uma relevante correlação entre os coagulotipos/ribotipos e os tipos de sequência multilocus, assim como também obsevou-se uma correlação entre os coagulotipos/ribotipos e os diferentes pulsotipos agrupados em clusters e/ou relacionados a clones internacionais.

A associação entre as técnicas de ribotipagem-PCR e polimorfismo do gene da coagulase demonstrou ser uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos, podendo ser utilizada em um estudo epidemiológico molecular inicial no ambiente hospitalar. Adicionalmente as técnicas citadas apresentam a vantagem de serem menos laboriosas e de baixo custo quando comparadas a outras técnicas de genotipagem. Nenhum método isoladamente é suficiente para genotipagem de *S. aureus*, portanto a associação de diferentes técnicas se torna necessário para um estudo mais aprofundado do patógeno.

Em resumo, no presente estudo foi documentada a presença de vários clones MRSA, cepas portadoras de diversos tipos de genes toxigênicos, bem como novos tipos de MLST e *spa*. Além disso, foi possível observar uma alta frequência de isolados OS-MRSA, tornando-se necessário mais pesquisas para determinar o grau de dispersão dos OS-MRSA no Brasil. Não foi possível observar uma correlação entre um determinado sítio de infecção e um tipo clonal específico. Os resultados podem ser úteis no monitoramento de cepas patogênicas no país, assim como podem contribuir com as comissões de controle de infecção hospitalar no conhecimento da presença de isolados relacionados a clones epidêmicos, portadores de diversos genes toxigênicos, dispersos no ambiente hospitalar, uma vez que os dados sobre *S. aureus* permanecem insuficientes na área.

7. Conclusões

- Neste estudo foi observada uma alta frequência de *S. aureus* portadores de genes toxigênicos, isolados de amostras clínicas diversas, provenientes de pacientes admitidos nos diferentes setores dos hospitais estudados e relacionados a diversos clones epidêmicos, representando potencial risco para a saúde pública, pois estes podem ser responsáveis doenças graves no ambiente hospitalar;
- Foi verificado um grande polimorfismo genético entre os isolados, especialmente entre os isolados BEC. Os dados indicam que essa diversidade pode ser observada em outros hospitais da cidade e em outras regiões do país;
- Os resultados obtidos demonstraram alguns isolados relacionados a clones com raras descrições nos bancos de dados internacionais e cepas desconhecidas no Brasil, comportando novos tipos de sequência multilocus e tipos de gene *spa*. Os dados sugerem que estas bactérias podem ter sofrido mutações ao longo dos anos e que esta diversidade possivelmente pode ser observada em outros hospitais da cidade e em outras regiões do país, podendo acarretar implicações no tratamento dos pacientes;
- Verificou-se uma elevada frequência de isolados OS-MRSA, sendo responsáveis por infecções graves em pacientes hospitalizados, tornando-se um novo desafio para a

clínica médica, induzindo uma terapêutica inadequada visto que os isolados podem ser resistentes ao antibiótico *in vivo*;

- Adicionalmente, foi descrita a existência de diversos clones e isolados intimamente relacionados entre os diferentes setores do principal hospital estudado (hospital 1) e entre este e os outros hospitais analisados, o que sugere uma possível dispersão destas bactérias no ambiente hospitalar, podendo ser responsáveis por infecções nosocomiais;
- A associação das técnicas de ribotipagem-PCR e polimorfismo do gene da coagulase demonstrou ser uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos iniciais em ambientes hospitalares, exibindo uma relevante correlação entre os coagulotipos/ribotipos e os tipos de sequência multilocus, assim como demonstrou uma correlação entre os coagulotipos/ribotipos e os diferentes pulsotipos agrupados em clusters e/ou relacionados a clones internacionais;
- O presente estudo permitiu gerar novos conhecimentos e informações a respeito dos isolados MRSA e MSSA na nossa região. Foi possível, dessa forma, compreender melhor os perfis moleculares dos isolados e assim inferir as relações genéticas entre os diferentes clones analisados provenientes de pacientes presentes no ambiente hospitalar.

8. Referências Bibliográficas

- Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM. 1995. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. Canadian journal of veterinary research. Revue canadienne de recherche veterinaire 59:124-128.
- Akineden Ö, Annemüller C, Hassan A, Lämmler C, Wolter W, et al. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clinical and diagnostic laboratory immunology 8: 959-964.
- Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, et al. 2005. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. Journal of Infectious Diseases 192: 801-810.
- Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, et al. 2005. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. Journal of Infectious Diseases 192: 801-810.
- Baird-Parker A. 1990. The staphylococci: an introduction. Journal of Applied Microbiology 69: 1S-8S.
- Baker MD, Acharya KR. 2004. Superantigens: structure-function relationships. International Journal of Medical Microbiology 293: 529-537.
- Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 61: 1-10.
- Bania J, Dabrowska A, Bystron J, Korzekwa K, Chrzanowska J, et al. 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. International journal of food microbiology 108: 36-41.
- Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K, Zarczynska A, Bystron J, Chrzanowska J, Molenda J. 2006. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. Letters in applied microbiology 42:315-320.
- Bayles KW, Iandolo JJ. 1989. Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. Journal of Bacteriology, Washington, v. 171, p. 4799-4806,
- Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, et al. 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. Journal of clinical microbiology 41: 1434-1439.
- Becker K, Roth R, Peters G. 1998. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. Journal of Clinical Microbiology 36: 2548-2553.
- Becker K, Roth R, Peters G. 1998. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. Journal of Clinical Microbiology 36: 2548-2553.
- Beltrame C, Botelho A, Silva-Carvalho M, Souza R, Bonelli R, et al. 2012. Restriction modification

(RM) tests associated to additional molecular markers for screening prevalent MRSA clones in Brazil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 2011-2016.

Bergdoll BM. 1990. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 10, p. 91-100.

Bergdoll M, Reiser R, Crass B, Robbins R, Davis J. 1981. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *The Lancet* 317: 1017-1021.

Bernardo WLC, Boriollo MFG, Gonçalves RB, Höfling JF. 2005. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 47:19-24.

Bes, M. et al. 2002. Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: typing by 16S-23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, p. 2275-2277.

Betley MJ, Mekalanos JJ. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, Washington, v. 229, p. 185-187.

Bezanson G, Macdonald J, Drebot M. Polymorphism in ribosome spacer DNA *amplicons* permit differentiation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 1995, Washington, American Society for Microbiology, 1995, p. 283.

Blaiotta G et al. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, n. 5, p. 719-730.

Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. 2006. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and spa typing analyses. *Applied and environmental microbiology* 72: 6117-6123.

Blyth M, Estela C, Young AER. 2007. Severe staphylococcal scalded skin syndrome in children. *Burns*, Oxford, v. 34, p. 98-103.

Bougnoux M-E, Aanensen DM, Morand S, Théraud M, Spratt BG, et al. 2004. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* strategies, data exchange and applications. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 243-252.

Boyce JM, Havill NL. 2005. Nosocomial antibiotic-associated diarrhea associated with enterotoxin-producing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Gastroenterol.*, 100, 1828–1834.

Boyce, J.M.; Havill, N.L. 2005. Nosocomial Antibiotic-Associated Diarrhea Associated with Enterotoxin-Producing Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 1828–1834.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RMcontrole: Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modumo3/gramp_staphylo4.htm> Acesso em: 20 de outubro, 2012.

Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, Wahn U, Renz H. 2000. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in

atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 814–819.

Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MS, Santos DA, et al. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* 19: 9-14.

Casey A, Lambert PA, Elliott T. 2007. Staphylococci. *International journal of antimicrobial agents* 29:S23-S32.

Chambers HF, Deleo FR. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7: 629-641.

Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging infectious diseases* 7: 178.

Chiang YC. et al. 2006. PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L and M survey of staphylococcal enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 1072-1079.

Cliver DO. 1994. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker.

CLSI – Clinical and laboratory standards institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100/ S22, v. 32, n. 3.

Collery MM, Smyth DS, Tumilty JJG, Twohig JM, Smyth CJ. 2009. Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology* 58: 13-25.

Corkill JE, Anson JJ, Griffiths P, Hart CA. 2004. Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) in a methicillin-susceptible (*mecA* gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 229-231.

Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clinical Infectious Diseases* 39: 776-782.

de Barros MPS. 2007. Padronização e avaliação da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (pfge) para tipagem molecular das cepas de *Yersinia pestis* isoladas no nordeste. Recife. (Dissertação).

De Miranda O, Silva-Carvalho M, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro R, et al. 2007. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC*mecIV* that are related genetically to the USA800 clone. *Clinical Microbiology and Infection* 13: 1165-1172.

de Sousa MA, Conceicao T, Simas C, De Lencastre H. 2005. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *Journal of clinical microbiology* 43: 5150-5157.

Dego OK, Van Dijk J, Nederbragt H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary Quarterly* 24: 181-198.

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375:1557-1568.

- den Dunnen JT, van Ommen G-JB. 1992. Pulsed-field gel electrophoresis. *Protocols in Human Molecular Genetics*: Springer. pp. 169-182.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE. 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution* 8: 747-763.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE. 2009. The Molecular Evolution of Hospital- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Molecular Medicine* 9: 100-115.
- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 13, p. 16-34.
- Donabedian, S. M., C. L. Moore, M. B. Perri, T. Chua, and M. J. Zervos. 2009. Do laboratory characteristics predict outcome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Clin. Microbiol. Infect.* 15(s4):S540.
- Donnio P-Y, Février F, Bifani P, Dehem M, Kervégant C, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 4342-4350.
- Dossett JH, Kronvall G, Williams RC, Quie PG. 1969. Antiphagocytic Effects of Staphylococcal Protein A. *The Journal of Immunology* 103: 1405-1410.
- Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, et al. (2006) Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *Journal of clinical microbiology* 44: 847-853.
- Elliott MJ, Kellum MT, Tenover FC, Pettriess RL. 2002. Nasal Carriage of Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Paramedics in the Sedgwick County Emergency Medical Service in Wichita, Kansas*. *Infection control and hospital epidemiology* 23: 60-61.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38:1008-1015.
- Etienne J. 2005. Panton-Valentine Leukocidin: A Marker of Severity for *Staphylococcus aureus* Infection? *Clinical Infectious Diseases* 41: 591-593.
- Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 8821-8826.
- Fluit AC et al. 2001. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 3727-3732.
- Fogel G, Collins C, Li J, Brunk C. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* 38: 93-113.

- Franco BDGM, Landgraff M. 2000. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu.
- Fraser JD, Proft T. 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunological reviews 225: 226-243.
- Frazier WC, Weshoff DC. 2000. Microbiologia de los Alimentos. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Freitas M, Pinheiro Júnior J, Stamford T, Rabelo SA, Silva D, et al. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. Biológico, São Paulo 72: 171-177.
- Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, WP Júnior J, Stamford TLM, et al. 2008. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. Pesquisa Veterinária Brasileira 28: 617-621.
- Friedrich A, Witte W, Harmsen D, de Lencastre H, Hryniewicz W, et al. 2006. SeqNet. org: a European laboratory network for sequence-based typing of microbial pathogens. Euro surveillance: bulletin european sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin 11: E060112. 060114.
- Fuda C, Fisher J, Mobashery S. 2005. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. Cellular and molecular life sciences 62: 2617-2633.
- Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. 2004. The basis for resistance to β -lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry 279: 40802.
- Fujishima H, Okada N, Dogru M, Baba F, Tomita M, et al. 2012. The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. Allergy 67: 799-803.
- Gao J, Stewart GC. 2004. Regulatory Elements of the *Staphylococcus aureus* Protein A (Spa) Promoter. Journal of Bacteriology 186: 3738-3748.
- García MS, De la Torre MÁ, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, et al. 2010. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. JAMA: The Journal of the American Medical Association 303: 2260-2264.
- Goh S-H, Byrne S, Zhang J, Chow A. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. Journal of clinical microbiology 30: 1642-1645.
- Gordon RJ, Lowy FD. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clinical infectious diseases 46: S350-S359.
- Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, et al. 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 39, n. 2, p. 96-104.
- Grimont F, Grimont PAD. La Carte D'Identite moleculaire des bacteries. Bulletin de La Societe Francese Microbiologic, Paris, v. 6, p. 9-12, 1991.
- Guignard B, Entenza JM, Moreillon P. 2005. β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Current Opinion in Pharmacology 5: 479-489.
- Gürtler V, Barrie HD. 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. Microbiology 141: 1255-1265.

- Hall JC. 1991. Manual of Skin Diseases. 6. ed. Philadelphia: Lippincot.
- Hamad ARA, Marrack P, Kappler JW. 1997. Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins. The Journal of experimental medicine 185: 1447-1454.
- Hanssen A-M, Kjeldsen G, Sollid JUE. 2004. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? Antimicrobial agents and chemotherapy 48: 285-296.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. 2003. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. Journal of Clinical Microbiology 41:5442-5448.
- Hennekinne J, De Buyser M.; Dragacci S. 2011. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiology Reviews, v. 36, n. 4, p. 815-36.
- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS microbiology reviews 36: 815-836.
- Hu D-L, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima M, et al. 2011. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Tohoku journal of experimental medicine 225: 161-169.
- Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, et al. 2004. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. Journal of clinical microbiology 42: 1875-1884.
- Ingraham JL, Ingraham CA. 2010. Introdução à Microbiologia, Uma Abordagem Baseada em Estudos de Casos. Tradução da 3ª edição norte-americana. 1. ed., São Paulo: Cengage Learning.
- Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug resistance updates 6: 41-52.
- IWG-SCC – International Working Group on The Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. Disponível em: < http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html>. Acesso em 25 de outubro, 2012.
- Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, et al. 1999. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. Journal of clinical microbiology 37: 2446-2449.
- Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, et al. 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. The Journal of Immunology 166: 669-677.
- Jensen MA, Webster JA, Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, p. 945-952.
- Jensen MA, Webster JA, StrausN. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and

Environmental Microbiology, Washington, v. 59, p. 945-952.

Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, et al. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 426-430.

Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Igarashi H, Iwanaga S. 1989. Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic acids research* 17: 8871-8871.

Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Kawabata S, Morita T, et al. 1987. Nucleotide Sequence of the Staphylocoagulase Gene: Its Unique COOH-Terminal 8 Tandem Repeats. *Journal of Biochemistry* 102: 1177-1186.

Kapur V, Sischo WM, Greer RS, Whittam TS, Musser JM. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Journal of clinical microbiology* 33: 376-380.

Kelley PG, Gao W, Ward PB, Howden BP. 2011. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66: 1057-1060.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, et al. 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 298: 1763-1771.

Kloss WE, Lambe JR. 1991. *Staphylococcus*. In: Balows, A. *Manual of Clinical Microbiology*. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1500 p.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, et al. 2007. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 264-274.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, et al. 2007. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 264-274.

Koneman EW. 2001. Cocos gram-positivos: Parte I: Estafilococos e microrganismos relacionados. In Koneman, E. W. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5. ed., Rio de Janeiro: Medsi, p. 551-588.

Kostman J, Edlind T, LiPuma J, Stull T. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2084-2087.

Kostman JR, Alden MB, Mair M, Edlind TD, LiPuma JJ, et al. 1995. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Infectious Diseases* 171: 204-208.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, et al. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 357: 1225-1240.

Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. 1999. Clinical, microbial, and

biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical microbiology reviews* 12:224-242.

Ladhani S, Robbie S, Garratt RC, Chapple DS, Joannou CL, et al. 2001. Development and evaluation of detection systems for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. *Journal of clinical microbiology* 39: 2050-2054.

Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary microbiology* 67: 127-141.

Lawrence C, Cosseron M, Mimoz O, Brun-Buisson C, Costa Y, et al. 1996. Use of the coagulase gene typing method for detection of carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37: 687-696.

Lee CY, Schmidt J, Johnson-Winegar A, Spero L, Iandolo J. 1987. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 169: 3904-3909.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of applied microbiology* 95: 38-43.

Lin Z, Kotler DP, Schlievert PM, Sordillo EM. 2010. Staphylococcal enterocolitis: forgotten but not gone? *Dis Sci* 55: 1200-1207.

Lina G, Gillet Y, Vandenesch F, Jones ME, Floret D, et al. 1997. Toxin involvement in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clinical infectious diseases* 25: 1369-1373.

Liu GY. 2009. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatric research* 65: 71R-77R.

Loir YL, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. *Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto*, v. 2, p. 63-76.

Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 9, p. 1265-1273.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, et al. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3140-3145.

Mainardi J-L, Shlaes DM, Goering RV, Shlaes JH, Acar JF, et al. 1995. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases* 171: 1646-1650.

Malachowa N, DeLeo FR. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* 67: 3057-3071.

Marimón JM, Villar M, García-Arenzana JM, Caba IdI, Pérez-Trallero E. 2012. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leucocidin genes in northern Spain. *Journal of Infection* 64: 47-53.

Martin M, Fueyo J, González-Hevia M, Mendoza MC. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *International journal of food microbiology* 94: 279-286.

McCarthy AJ, Lindsay JA. 2010. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen

interactions. BMC microbiology 10: 173.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, et al. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. Journal of Clinical Microbiology 41: 5113-5120.

Mehndiratta P, Bhalla P. 2012. Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. Indian journal of medical microbiology 30: 16.

Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. 2010. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. Brazilian Journal of Infectious Diseases 14:79-86.

Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, Rothganger J, Sammeth M, et al. 2007. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. BMC Microbiol 7: 98.

Melo GB, Melo MC, Gama AP, Carvalho KS, Jesus TC, et al. 2005. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Brazilian Journal of Microbiology 36: 126-130.

Melo MC, Silva-Carvalho MC, Ferreira RL, Coelho LR, Souza RR, et al. 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.

Millar B, Loughrey A, Elborn J, Moore J. 2007. Proposed definitions of community-associated. Journal of Hospital Infection 67: 109e113.

Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin R, Williams R. Microbiologia Médica. 2. ed., São Paulo: Manole Ltda, 1999.

Murray PR, Drew WL, Kobayashi GS, Thompson JH Jr. 1992. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2010. *Staphylococcus* e cocos gram positivos relacionados. In: Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. Microbiologia Médica. 6. ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Limitada, p. 717-786.

National Center of Biotechnology Information (NCBI). TaxBrowser, Washington, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>>. Acesso em: 1 de fevereiro 2013.

Nimmo GR, Coombs GW. 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. International journal of antimicrobial agents 31: 401.

Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes and infection 3: 585-594.

Olive DM, BeanP. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 37, p. 1661-1669.

Oliveira AM, Ramos MC. 2002. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 35, p. 175-180.

Oliveira DC, de Lencastre H. 2011. Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Is Not Affected by the Overexpression in Trans of the *mecA* Gene Repressor: A Surprising Observation. PLoS ONE 6: e23287.

Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. 2002. Secrets of success of a human pathogen:

molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet infectious diseases 2: 180-189.

Oliveira GAMD, Dell'Aquila AMMD, Masiero RLP, Levy CEP, Gomes MSP, et al. 2001. Isolation in Brazil of Nosocomial *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin.

Omoie K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D-L, Ueda S, et al. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. Journal of Clinical Microbiology 40: 857-862.

Omoie, K et al. 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* ou *sei* genes. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, p. 857-862.

Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. 2010. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins 2:2117-2131.

Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DY, Gutierrez JA, Bohach GA, et al. 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infection and immunity 71: 2916-2919.

Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infection and immunity 69: 360-366.

Palazzo IC, Araujo ML, Darini AL. 2005. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. J Clin Microbiol 43: 179-185.

Palmqvist R, Hallmans G, Rinaldi S, Biessy C, Stenling R, et al. 2002. Plasma insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. Gut 50: 642-646.

Parham, P. 2001. O Sistema Imune. Porto Alegre: Artmed.

Parsonnet J. 1998. Case definition of staphylococcal TSS: A proposed revision incorporating laboratory finding. In: Arbuthnott, J.; Furman, B. (Ed.). European Conference on Toxic Shock Syndrome. International Congress and Symposium Series 229. New York: Royal Society of Medicine.

Perez LRR, D'azevedo PA. 2008. Tipos de clones e perfis de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isolados de hospitais no sul do Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 50: 135-137.

Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. 2001. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47: 297-304.

Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. 2010. Staphylococcal enterotoxins. Toxins 2: 2177-2197.

Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. 2008. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? Clinical infectious diseases 46: 787-794.

Raimundo O, Deighton M, Capstick J, Gerraty N. 1999. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. Veterinary microbiology 66: 275-284.

Rajagopalan G, Smart MK, Murali N, Patel R, David CS. 2007. Acute systemic immune activation following vaginal exposure to staphylococcal enterotoxin B—Implications for menstrual shock. *Journal of reproductive immunology* 73: 51-59.

Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes Jr. A, et al. 2010. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 59-65.

Rehm SJ, Tice A. 2010. *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 2, p. S176-82.

Reiss MA. 2000. Toxic shock syndrome. Primary care update for Obstetricians and Gynecologists, New York, v. 7, p. 85-90.

Ren K, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, et al. 1994. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *The Journal of experimental medicine* 180: 1675-1683.

Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, et al. 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 MC, Berquó L, Ferreira FA, et al. 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *Journal of clinical microbiology* 43: 1985-1988.

Roberts RB, de Lencastre A, Eisner W, Severina EP, Shopsin B, et al. 1998. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. *Journal of Infectious Diseases* 178: 164-171.

Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, Zurita J, Labarca J, Luna CM, Salles MJC, Gotuzzo E. 2010. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases* 14:e560-e566.

Rosec JP, Gigaud O. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 25, p. 61-67.

Rossi F, Andreazzi DB. 2004. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. 1. ed., Rio de Janeiro: Atheneu.

Rozenbaum R, AL Schuenck R, FMCS Neves R, LRPOF Silva R. 2006. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disseminated in a Home Care System. *Infection control and hospital epidemiology* 27: 1041-1050.

Rupp J, Fenner I, Solbach W, Gieffers J. 2006. Be aware of the possibility of false-positive results in single-locus PCR assays for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 44: 2317-2317.

Ruzin A, Lindsay J, Novick RP. Molecular genetics of SaPI1- a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, Salem, v. 41, p. 365-377, 2001.

Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN. 1994. Evaluation of interhospital spread of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infection control and hospital epidemiology*: 320-323.

Sá-Leão R, Sanches IS, Dias D, Peres I, Barros RM, et al. 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? *Journal of clinical microbiology* 37: 1913-1920.

Santos F, Mota R, Silveira-Filho V, Souza H, Oliveira M, et al. 2003. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Rev Napgama* 6: 19-23.

Santos-Filho, L. 2003. Manual de Microbiologia Clínica. 3. ed. João Pessoa: Ed. Universitária.

Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E. 1982. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemiologic Observations During a Community-Acquired Outbreak. *Annals of Internal Medicine* 96: 11-16.

Sato H, Matsumori Y, Tanabe T, Saito H, Shimizu A, et al. 1994. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infection and immunity* 62: 3780-3785.

Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. 2002. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2:580-592.

Schlegelova J, Dendis M, Benedik J, Babak V, Ryšánek D. 2003. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. *Veterinary microbiology* 92: 327-334.

Schmitz FJ, MacKenzie CR, Geisel R, Wagner S, Idel H, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP. 1997. Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Production of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains. *Eur. J. Epidemiol.*, 13, 699–708.

Schmitz, F.J.; MacKenzie, C.R.; Geisel, R.; Wagner, S.; Idel, H.; Verhoef, J.; Hadding, U.; Heinz, H.P. 1997. Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Production of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains. *Eur. J. Epidemiol.* 13, 699–708.

Schuenck RP, Cavalcante FS, Emery E, Giambiagi-de Marval M, dos Santos KR 2012. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65: 501-504.

Schuenck RP, Nouér SA, Winter CdO, Cavalcante FS, Scotti TD, et al. 2009. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 64: 434-441.

Science Photo Library. London, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/>>. Acesso em: 11 de outubro, 2012.

Scribel LV, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Superti SV, Kvitko CH, et al. 2009. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 65: 457-

461.

Sharff KA, Monecke S, Slaughter S, Forrest G, Pfeiffer C, et al. 2012. Genotypic resistance testing creates new treatment challenges: two cases of oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 50: 4151-4153.

Shittu A, LIN J, Morrison D, Kolawole D. 2006. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. Journal of Medical Microbiology, London, v. 55: p. 317-324.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery S, Smith D, Waddington M, et al. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology 37: 3556-3563.

Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging infectious diseases 7: 323

Shopsin B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo M, et al. 2000. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. Journal of Infectious Diseases 182: 359-362.

Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, et al. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy 55: 3765-3773.

Shore AC, Rossney AS, O'Connell B, Herra CM, Sullivan DJ, et al. 2008. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*-Associated DNA Segments in Multiresistant Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and Identification of *Staphylococcus epidermidis* *ccrAB4* in both Methicillin-Resistant *S. aureus* and MSSA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52: 4407-4419.

Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, dos Santos LC, et al. 2009. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCC*mecIV* in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 65: 300-305.

Simon SS, Sanjeev S. 2006. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. Food Control, Guildford, v. 18, p. 1565-1568.

Soares MJ, Tokumaru-Miyazaki NH, Noleto AL, Figueiredo AM. 1997. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. J Med Microbiol 46: 214-221.

Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnera A, et al. 2012. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. PloS one 7: e30487.

Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, et al. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. Veterinary microbiology 96: 91-102.

Sousa-Junior FCd, Silva-Carvalho MC, Fernandes MJBC, Vieira MFP, Pellegrino FLPC, et al. 2009. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 42: 877-881.

Souza RR, Coelho LR, Botelho AMN, Ribeiro A, Rito PN, et al. 2009. Biofilm formation and prevalence of lukF-pv, seb, sec and tst genes among hospital- and community-acquired isolates of some international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 203-207.

Souza RR, Coelho LR, Botelho AMN, Ribeiro A, Rito PN, et al. 2009. Biofilm formation and prevalence of lukF-pv, seb, sec and tst genes among hospital- and community-acquired isolates of some international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 203-207.

Spicer WJ. Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Spratt BG. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current opinion in microbiology* 2: 312-316.

Stamford TLM, Silva CGM, Mota RA, Cunha Neto A. 2006. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* spp. isolated of milk in natura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26: 41-45.

Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, et al. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents* 39: 273.

Stefani S, Goglio A. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *International Journal of Infectious Diseases* 14:S19-S22.

Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, et al. 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases* 195: 202-211.

Su C, Herbelin C, Frieze N, Skardova O, Sordillo LM. 1999. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiology & Infection* 122: 329-336.

Tammelin A, Klötz F, Hambræus A, Ståhle E, Ransjö U. 2003. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in staff at a Department for Thoracic and Cardiovascular Surgery: endogenous or exogenous source? *Infection control and hospital epidemiology* 24: 686-689.

Tavares, W. 2000. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301.

Teixeira L, Resende C, Ormonde L, Rosenbaum R, Figueiredo A, et al. 1995. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *Journal of clinical microbiology* 33: 2400-2404.

Teixeira MM, Araújo MC, Silva-Carvalho MC, Beltrame CO, Oliveira CCHB, et al. 2012. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 637-643.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 32:407-415.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, et al. 1995. Interpreting

chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.

Tenover FC, Goering RV. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 441-446.

Tenover, F., S. McAllister, G. Fosheim, L. McDougal, R. Carey, B. Limbago, D. Lonsway, J. Patel, M. Kuehnert, and R. Gorwitz. 2008. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* 46:2837–2841.

Tong SY, Chen LF, Fowler VG, Jr. 2012 Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol* 34: 185-200.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Bactérias. In: Microbiologia. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

Tortora JC, De Sousa TL, Lourenco MC, Lopes HR.1996. Nosocomial occurrence of enterotoxigenic multiresistant *Staphylococcus* strains in Rio de Janeiro. *Rev Latinoam Microbiol* 38: 1-6.

Trabulsi LR. et al. 2002. Microbiologia. 3. ed., São Paulo: Ed. Atheneu.

Trindade PdA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, et al. 2005. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 43: 3435-3437.

Trindade PdA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, et al. 2005. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 43: 3435-3437.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. 2011. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 60: 95-103.

Udo E, Pearman J, Grubb W. 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Journal of Hospital Infection* 25: 97-108.

van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 275-293.

Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, Guh A, Wang X, et al. 2009. Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York. *Applied and environmental microbiology* 75: 6839-6849.

Vasconcelos NG, Pereira VC, Araujo Junior JP, da Cunha Mde L. 2011. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J Appl Microbiol* 111: 749-762.

Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, Pacheco RL, Costa SF, et al. 2009. Differences between "classical" risk factors for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV MRSA strain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30: 139-145.

Vivoni AM, Diep BA, de Gouveia Magalhães AC, Santos KRN, Riley LW, et al. 2006. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of

international circulating lineages. *Journal of clinical microbiology* 44: 1686-1691.

Vojtov N, Ross HF, Novick RP. 2002. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10102-10107.

Wannet, W., E. Spalburg, M. Heck, G. Pluister, R. Willems, and A. De

Neeling. 2004. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic Berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level

resistance to oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* 42:3077–3082.

White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, et al. 1989. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56: 27-35.

Witte, W., M. Kresken, C. Bräulke, and C. Cuny. 1997. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

(MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German

hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 3:414–422.

Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, Tomasz A. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance* 2: 435-441.

Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, et al. 2011. Genotypes and Toxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from China. *PLoS ONE* 6: e28276.

Xu SX, McCormick JK. 2012. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.

Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, et al. 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and immunity* 70: 5835-5845.

Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 168, p. 227-233.

9. Curriculum vitae (Lattes) restrito ao período de vínculo ao PPGG

Formação Acadêmica/Titulação

- 2011 - 2012** Doutorado-sanduíche.
University of Pittsburgh, Division of Infectious Diseases, Pittsburgh, PA, EUA.
Orientador: Dr. Lee H. Harrison, MD.
Financiamento: Global Infectious Diseases Research Training Program, National Institutes of Health (NIH)
- 2009 -** Doutoranda em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG)-UFPE
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM-FIOCRUZ, Brasil.
Título: Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* Meticilina Sensíveis e Meticilina Resistentes Isolados de Amostras Clínicas.
Orientador: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
-

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2011 –** **Vínculo: Professor Colaborador**, **Disciplina:** Bacteriologia Molecular / Fatores de patogenicidade em bactérias, resistência e tipagem molecular abordando as peculiaridades em *Staphylococcus aureus*, **Curso de Pós-graduação:** Ciências Biológicas (CCB/UFPE). Coordenação: Dra. Alzira Medeiros
- 2005 –** **Vínculo: Professor Colaborador**, **Disciplina:** Exames bacteriológicos / **Curso de graduação:** Biomedicina (Departamento de Antibióticos/UFPE). Coordenação: Dra. Kêsia Xisto
- 2007 –** **Pesquisa e extensão: vínculo: Professor colaborador**, Colaboração com o Colégio Damas para educação em ciências. Ensino médio (Departamento de Antibióticos/UFPE).

2. FAFIRE

Vínculo institucional

- 2011 – 2011** **Vínculo: Professor Colaborador**, **Disciplina:** Vigilância Epidemiológica em Saúde Ambiental, **Curso de Pós-graduação:** Saúde ambiental.

Formação complementar

- 2011– 2011** II Curso de Bioinformática: análise de dados Moleculares. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.
- 2010 – 2010** X Curso Internacional de Epidemiologia Molecular em Doenças Infecciosas e Parasitárias Emergentes/ Saúde Pública. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/Fiocruz, Bahia, Brasil.
- 2010 – 2010** I Workshop Interno do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Brasil.

Prêmios e títulos

- 2012** Menção honrosa pela participação nas apresentações orais da II Jornada de Pós-graduação em Genética.
Título: Caracterização Molecular de *Staphylococcus aureus* Isolados de Amostras Clínicas.
- 2012** Trabalho Premiado em 1º lugar na XIX Semana de Biomedicina, UFPE.
Título: Caracterização Molecular do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus*.
- 2011** Trabalho Premiado em 1º lugar na XVIII Semana de Biomedicina, UFPE.
Título: Investigação do gene de resistência à meticilina (*mecA*) e do cluster gênico de enterotoxinas (*egc*) em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.
- 2009** Primeiro Lugar na Seleção de Doutorado em Genética (PPGG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos submetidos para publicação em periódicos

1. Mariana Andrade-Figueiredo, Tereza Cristina Leal-Balbino, Jane W. Marsh, Jessica L. Schlackman, Lee H. Harrison. Genotyping of Methicillin Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Hospitals in Brazil. **Journal of Infection**. ISSN- 0163-4453. JCR: 4,126. QUALIS^{CAPES}: A2, Ciências Biológicas II (Internacional), 2013. (submetido).
2. Mariana Andrade-Figueiredo, Ana Carolina de Oliveira Luz, Thiago Ferreira de Barros, Tereza Cristina Leal-Balbino. Comparison of Genotyping Methods and Toxin Gene Profiles of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. ISSN- 0732-8893. JCR: 2.528. QUALIS^{CAPES}: B1, Ciências Biológicas II (Internacional), 2013. (submetido).

Trabalhos publicados em anais de eventos (completos)

1. Andrade, Mariana de Azevedo. Caracterização molecular *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. II Jornada de Pós-graduação em Genética, Recife, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos)

1. Andrade, MA; Luz, ACO; Barros,TF; Harrison,L; Leal-Balbino, TC. Caracterização molecular e de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, Petrolina, 2012.
2. Luz, ACO; Andrade, MA; Harrison, L; Leal-Balbino, TC. Caracterização Molecular do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus*. XIX Semana de Biomedicina, UFPE, Recife, 2012.
3. Luz, ACO; Andrade-Figueiredo, M; Barros,TF; Leal-Balbino, TC. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates in Northeast, Brazil. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), Santos, Brasil, 2012.
4. Andrade-Figueiredo, M; Luz, ACO; Almeida, BCC; Harrison,LH; Leal-Balbino, TC. Molecular Characterization of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) in *Staphylococcus aureus* from Northeast, Brazil. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), Santos, Brasil, 2012.
5. Luz, ACO; Andrade, MA; Leal-Balbino, TC. Investigação do gene de resistência à meticilina (*mecA*) e do cluster gênico de enterotoxinas (*egc*) em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. XVIII Semana de Biomedicina, UFPE, Recife, 2011.
6. Andrade, MA; Luz, ACO; Leal-Balbino, TC. Caracterização molecular e de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. 2. I Jornada de Pós-graduação em Genética, UFPE, Recife, 2011.

Orientações e Supervisões**➤ Trabalhos de conclusão de curso de graduação:**

1. **Ana Carolina de Oliveira Luz.** Caracterização Molecular de Isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus*. Universidade Federal de Pernambuco, Curso de Biomedicina, 2013. (Orientação)

➤ Trabalhos de Iniciação Científica:

1. **Antônio Henrique Santana Cavalcante.** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE HOSPITAIS PÚBLICOS DA CIDADE DO RECIFE-PE. CPqAM-Fiocruz, 2013. PIBIC/CNPq. Co-orientação (em andamento)
2. **Bárbara Caroline Cavalcanti de Almeida.** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS. CPqAM-Fiocruz, 2011-2013. PIBIC/FACEPE. Co-orientação.

3. **Ana Carolina de Oliveira Luz.** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS EXOTOXINAS EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS. CPqAM-Fiocruz, 2010-2013. PIBIC/FACEPE. Co-orientação.
 4. **Thiago Ferreira de Barros.** INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE À METICILINA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS EXOTOXINAS EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS. CPqAM-Fiocruz, 2010. PIBIC/CNPq. Co-orientação.
 5. **Ana Paula Freire.** IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ENTEROTOXINAS EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE E PRODUTOS DERIVADOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO. CPqAM-Fiocruz, 2009. PIBIC/CNPq. Co-orientação.
-

Eventos

Participação em eventos

1. **II Jornada de Pós-graduação em Genética**, Recife, 2012.
 2. **I Jornada de Pós-graduação em Genética**, Recife, 2011.
 3. **Congressista** no **XII Congresso Brasileiro de Biomedicina**, Recife, 2010.
 4. **Conferencista** no(a) **MEDTROP 2009 - XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2009. (Congresso).
Título: Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.
-

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. ANDRADE, M. A.
Presidiu a Banca Examinadora de Ana Carolina de Oliveira Luz. **Caracterização Molecular de Isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus***, 2013.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
2. ANDRADE, M. A.
Participação em banca de Larissa Mayra de Lima Santos. **Isolamento e Identificação dos Gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* em Ônibus da Região Metropolitana do Recife-PE**, 2012.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
3. ANDRADE, M. A.
Participação como suplente em banca de Genildo Rodrigo Brayner Bernardo. **Atividade Antifúngica de Actinobactérias da Rizosfera de *Terminalia fagifolia* (Bioma Caatinga) ativas contra *Cândida spp***, 2012.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

4. ANDRADE, M. A.
Participação como suplente em banca de Rodrigo Santana do Nascimento. **Prevalência de bactérias produtoras de carbapenemases em hospital universitário, Recife-PE**, 2010.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
5. ANDRADE, M. A., GUSMÃO, N. B.; ARAÚJO, R. O.; SOLIDÔNIO, E. G.; SENA, K. X. F. R.
Participação como suplente em banca de Elis Priscila Fernandes dos Santos. **Isolamento de *Staphylococcus* spp. Em cédulas e moedas de real de uso corrente**, 2010.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
6. ANDRADE, M. A., ARAÚJO, R. O.; SOLIDÔNIO, E. G.; MIRANDA, R. C.M.; ARAUJO, J. M.; SENA, K. X. F. R.
Participação em banca de Bruno da Silveira Pinto. **Avaliação da resistência de *Enterococcus* spp em relação às drogas beta lactâmicas e aos aminoglicosídeos**, 2010.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco
7. ANDRADE, M. A., GUSMÃO, N. B.; AGUIAR, J. S.; SENA, K. X. F. R.
Participação em banca de Tâmara de Melo Cahu Wanderley. **Avaliação do Perfil de Susceptibilidade de *Enterococcus* spp. Isolados de Diferentes Sítios de Infecção**, 2009.
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Pós-Graduação

1. ANDRADE, M. A.; SOUZA, P. R. E.; MUNIZ, M. T. C.; VASCONCELOS, L. R. S.
Participação em banca de Camilla Albertina Dantas de Lima. **Deteção do Polimorfismo na Região 3'UTR +1188 do gene *IL12B* em mulheres portadoras de infecções por HPV e sua relação com lesões intraepiteliais cervicais**, 2010.
Universidade de Pernambuco (UPE), Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

Participação em banca de comissões julgadoras

1. COMISSÃO CIENTÍFICA DA XII CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMEDICINA - Biomedicina e Meio Ambiente: Desafios e Perspectivas, 2010.
Centro de Convenções, Recife, CRBM2.
2. Avaliador de Poster na área de SAÚDE PÚBLICA no XII CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMEDICINA - Biomedicina e Meio Ambiente: Desafios e Perspectivas, 2010.
3. Avaliador de Poster na área de MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, ALIMENTOS no XII CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMEDICINA - Biomedicina e Meio Ambiente: Desafios e Perspectivas, 2010.