



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

WAGNER LUIS MENDES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA À
METICILINA EM AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* spp.

Recife
2013

WAGNER LUIS MENDES DE OLIVEIRA

Avaliação da patogenicidade e do mecanismo de resistência à metilicina
em amostras de *Staphylococcus* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
Coorientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Recife

2013

O48a Oliveira, Wagner Luis Mendes de

Avaliação da patogenicidade e do mecanismo de resistência à metilina em amostras de *Staphylococcus* spp. / Wagner Luis Mendes de Oliveira. – Recife: O Autor, 2013.

43 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida

Coorientadora: Nilma Cintra Leal

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

Inclui bibliografia e anexos

1. *Staphylococcus aureus* 2. Bactérias patogênicas 3. Drogas – Resistência em micro-organismos I. Almeida, Alzira Maria Paiva de (orientadora) II. Leal, Nilma Cintra (coorientadora) III. Título.

579.353

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-110



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

WAGNER LUIS MENDES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

A Banca Examinadora, reunida aos 26 dias do mês de fevereiro do ano de 2013, considera o candidato **APROVADO**.

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CPqAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Universidade Federal Rural de Pernambuco
(UFRPE)

Profª. Dra. Marinalda Anselmo Vilela
Hospital Universitário Oswaldo Cruz
(HUOC-UPE)

Profª. Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CPqAM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus pela oportunidade do aperfeiçoamento intelectual e desenvolvimento de qualidades morais importantes para meu adiantamento.

À minha família, em especial a Maria da Paz Mendes de Oliveira (mãe) por compreender minhas ausências e a necessidade dos meus sonhos.

Após o término do mestrado, algumas pessoas me incentivaram a fazer o doutorado. Entre essas pessoas está a Dra Nilma Cintra Leal, a pesquisadora e bússola personificada, sempre me incentivando a pensar criticamente; depositando em mim responsabilidades as quais duvidei que pudesse corresponder a altura. Muito obrigado, principalmente pela paciência e carinho.

Outra pessoa muito importante foi a Dra Marinalda Anselmo Vilela, que conseguiu enxergar em mim o menino curioso e apaixonado por bactérias. É sem tamanho minha gratidão por sua inestimável colaboração neste trabalho. Agradeço pela amizade, sugestões e “links” que me abriram muitas vezes um horizonte vasto de conhecimentos e descobertas.

Agradeço a minha orientadora neste trabalho Dra. Alzira de Almeida pela oportunidade da orientação, disponibilidade para as correções necessárias durante o desenvolvimento do estudo.

Não posso deixar de citar parceiros imprescindíveis na construção deste trabalho como o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Dept. de Microbiologia), ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas e aos órgãos de fomento (FACEPE/CNPq).

No Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães estão outros valorosos colaboradores como a Silvana Santos, Niedja Azevedo e Fabiana Laura técnicos do Deptº de Microbiologia que me deram suporte para desenvolver minha pesquisa. Agradeço ainda a outros importantes colaboradores neste estudo como o Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Dra. Cássia Docena e o Dr. Ernesto Marques.

Não posso deixar de agradecer aos meus pupilos queridos, a Msc. Eduarda Manguiera e o biomédico Ewerton Lucena pela preciosa colaboração no estudo e pela valorosa amizade; e aos amigos do Dept de Microbiologia do CPqAM.

Por fim agradeço a uma pessoa que fez todos os esforços possíveis para que eu pudesse seguir nessa jornada e alcançar as conquistas de hoje. Alguém que ainda hoje, mesmo tão longe dos meus sentidos e tão perto do meu coração, não mede esforços em me ajudar nessa jornada, minha avó Maria do Carmo Silva.

Sonhar
Mais um sonho impossível
Lutar
Quando é fácil ceder
Vencer o inimigo invencível
Negar quando a regra é vender
Sofrer a tortura implacável
Romper a incabível prisão
Voar num limite improvável
Tocar o inacessível chão
É minha lei, é minha questão
Virar esse mundo
Cravar esse chão
Não me importa saber
Se é terrível demais
Quantas guerras terei que vencer
Por um pouco de paz
E amanhã, se esse chão que eu beijei
For meu leito e perdão
Vou saber que valeu delirar
E morrer de paixão
E assim, seja lá como for
Vai ter fim a infinita aflição
E o mundo vai ver uma flor
Brotar do impossível chão

Sonho Impossível - Chico Buarque

RESUMO

OLIVEIRA, W.L.M. Avaliação da patogenicidade e do mecanismo de resistência à metilicina em amostras de *Staphylococcus* spp. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

Os estafilococos fazem parte da microflora da pele e mucosa humana e podem se comportar como patógenos oportunistas. *Staphylococcus aureus* é a espécie responsável por grande número de infecções principalmente em ambiente hospitalar devido à diversidade de fatores de virulência que abriga. *Staphylococcus* Coagulase Negativo (SCN) vem se destacando como patógeno principalmente associado a colonização de biomateriais utilizados em procedimentos médicos. Como agravante essas bactérias têm capacidade de adquirir mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Neste trabalho analisamos mecanismos de patogenicidade (produção de biofilme e presença de genes toxigênicos) e resistência à metilicina (classificação do cassete *SCCmec* e produção de PBP2a) em *Staphylococcus* spp. de infecções nosocomiais de um hospital universitário da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. A maioria das amostras de *S. aureus* e SCN revelaram-se *icaAD* positivas e produtoras de biofilme no meio Agar Vermelho Congo-AVC. O loco *hlqCB* que codifica a γ -toxina foi encontrado em 42/45 (93,9%) *S. aureus* e 24/49 (49%) SCN; *lukSF* que codifica a leucocidina de Panton-Valentine-PVL, em 13/45 (28,9%) *S. aureus* e 06/49 (12%) SCN; e *tst* que codifica a toxina da síndrome do choque tóxico-TSST-1, foi encontrada em três das 45 amostras de *S. aureus* e uma das 49 amostras de SCN analisadas. Sessenta e oito dos 84 isolados analisados foram classificados nos seguintes tipos de *SCCmec*: *SCCmec* tipo II (17%), *SCCmec* tipo III (26%), *SCCmec* tipo IV (34,5%) e *SCCmec* tipo V (3,5%); em 19% dos isolados o tipo do *SCCmec* não foi determinado e nomeados como *SCCmec* Não Definido (ND). 61% da população estudada revelou-se resistente à oxacilina e 39% sensível nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e MHA suplementado com oxacilina e a presença da PBP2a foi detectada por *Western blot* com antissoro anti-PBP2a em 76% dos isolados. Em conclusão foram encontrados os genes da γ -toxina e da leucocidina de Panton-Valentine e do gene do choque tóxico em SCN. A presença de genes toxigênicos e genes associados epidemiologicamente com cepas da comunidade, em cepas nosocomiais de SCN, sugere transferência horizontal de genes e representa um importante incremento do potencial patogênico dos SCN no ambiente hospitalar. Foi demonstrado que a presença dos genes *icaAD* não está diretamente associada a formação de biofilme em testes fenotípicos (AVC e PCT), embora o meio AVC seja mais eficaz nessa determinação que o teste em PCT, principalmente se otimizado pela substituição de componentes na sua formulação (meios básicos e fonte de açúcar) e no inóculo (suplementação com glicose e NaCl). A diversidade de elementos *SCCmec* e a ocorrência de linhagens clonais associadas epidemiologicamente com a comunidade em ambiente hospitalar sugere que isolados de SCN podem atuar como reservatórios de elementos *SCCmec* contribuindo para emergência de novos clones metilicina resistentes e corrobora com a dissolução da classificação de cepas comunitárias e nosocomiais.

Palavras chaves: *Staphylococcus*, virulência, *SCCmec*, PBP2a

ABSTRACT

OLIVEIRA, W.L.M. Evaluation of the mechanism of pathogenicity and methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. Thesis (Doctorate in Biological Sciences) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

Staphylococci are usually present in the human skin and mucosa microflora but can behave as opportunistic pathogens. *Staphylococcus aureus* species harbors a diversity of virulence factors and is responsible for a number of hospital infections. Coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) has been emerging as a pathogen primarily associated with biomaterials used in medical procedures. Furthermore, these bacteria are capable of acquiring antimicrobial resistance mechanisms. In this work we studied pathogenicity (biofilm production and presence of toxigenic genes) and methicillin resistance (SCCmec cassette classification and PBP2a production) mechanisms in *Staphylococcus* spp., originated from nosocomial infections from a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. Most samples proved to be *icaAD*, positive, 71% of them produced biofilm on Congo red agar medium-CRA (32/45) and 38% in tissue culture plates-TCP (17/45). The *hlg* locus coding for γ -toxin was found in 42/45 (93.9%) *S. aureus* and 24/49 (48%) CoNS; *luk* coding for the Panton-Valentine leucocidine-PVL in 13/45 (28.9%) *S. aureus* and 06/49 (14%) CoNS; and *tst* coding the toxic shock syndrome toxin, TSST-1, was found in three of 45 *S. aureus* samples and one of the 49 CoNS samples analyzed. Of the 84 isolates 68 were classified into the following types of SCCmec types: SCCmec type II (17%), SCCmec type III (26%), SCCmec type IV (34.5%) and SCCmec type V (3.5%). The SCCmec type was not determined in 19% of the isolates and they were named SCCmec undefined. 61% of the studied population revealed oxacillin resistant and 39% sensitive through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Muller Hinton agar-oxacillin testing; and the presence of PBP2a was detected by Western blot with anti-PBP2a antiserum in 76% of the isolates. In conclusion, in this study, the γ -toxin, PVL and toxic shock syndrome toxin genes were reported for the first time in CoNS. The presence of toxigenic and community epidemiologically associated genes in nosocomial CoNS strains suggests horizontal gene transfer and represents an important increasing in the pathogenic potential of CoNS in the hospital environment. It was demonstrated that the presence of the *icaAD* genes do not correspond to biofilm production in phenotypic tests (CRA and TCP), besides CRA is more effective than TCP for *in vitro* biofilm production detection. The CRA can be further optimized by substitutions in its components formulation (basic media and sugar source) and using an inoculum supplemented with glucose and NaCl. The diversity of SCCmec elements and the occurrence of clonal lineages epidemiologically associated with the community in hospitals suggest that CoNS can act as SCCmec elements reservoir contributing to the emergence of new methicillin-resistant clones and confirms the dissolution of the categorization of Staphylococci isolates in nosocomial and community-acquired strains.

Keywords: *Staphylococcus*, virulence, SCCmec, PBP2a

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Características microscópicas do gênero <i>Staphylococcus</i>	17
FIGURA 2 - Características macroscópicas do gênero <i>Staphylococcus</i>	18
FIGURA 3 - Formação do biofilme por estafilococos em um dispositivo médico implantado.....	22
FIGURA 4 - O processo de síntese do polímero PIA.....	23
FIGURA 5 - Representação esquemática das proteínas BlaR1 e/ou MecR1.....	25
FIGURA 6 - Representação esquemática das proteínas BlaI e MecI.....	26
FIGURA 7 – Representação esquemática do elemento SCCmec.....	28
FIGURA 8 - Estrutura dos principais SCCmec.....	30

ARTIGO 1

FIGURA 1 - Gel de agarose 1,5%, mostrando os produtos amplificados por PCR dos genes de virulência.....	53
--	----

ARTIGO 2

FIGURA 1 - Aspecto das colônias de <i>Staphylococcus</i> spp em meio AVC.....	70
FIGURA 2 - Teste em placa de cultura de tecido com 96 poços com células aderidas coradas com cristal violeta.....	71
FIGURA 3 - Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados por PCR do cluster <i>icaAD</i>	72

ARTIGO 3

FIGURA 1 - CIM de oxacilina para <i>S. aureus</i> e SCN, segundo os parâmetros do CLSI (2012).....	91
FIGURA 2 - Presença e ausência de PBP2a entre os isolados de <i>S. aureus</i> e SCN sensíveis à oxacilina.....	92
FIGURA 3 - Análise da expressão de PBP2a em amostras de <i>Staphylococcus</i> spp, <i>mecA</i> positivo e sensíveis a oxacilina.....	93
FIGURA 4 - Gel de agarose 2% com as amplificações da multiplex-PCR para determinação do complexo <i>mec</i>	94
FIGURA 5 - Gel de agarose 2% com as amplificações da multiplex-PCR para determinação do complexo <i>ccr</i>	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Tipos de SCCmec identificados.....	27
TABELA 2 - Classes do complexo <i>mec</i>	28
TABELA 3 - Principais elementos SCCmec identificados em <i>Staphylococcus</i> spp	29

ARTIGO 1

TABELA 1 - <i>Primers</i> utilizados: genes alvo, sequência, referências.....	54
TABELA 2 - Distribuição das amostras nosocomiais de <i>S. aureus</i> e SCN por fonte de isolamento e genes amplificados por PCR.....	55

ARTIGO 2

TABELA 1 - Produção de biofilme em placas de cultura de tecido e Agar Vermelho Congo; presença e expressão de <i>icaAD</i> em <i>Staphylococcus aureus</i>	73
TABELA 2 - Produção de biofilme em placas de cultura de tecido e Agar Vermelho Congo; presença e expressão de <i>icaAD</i> em SCN.....	74
TABELA 3 - Produção de biofilme em placas de cultura de tecido e Agar vermelho Congo em <i>Staphylococcus aureus</i> e SCN.....	75

ARTIGO 3

TABELA 1 - <i>Primers</i> utilizados: sequências, genes alvo e referências.....	89
TABELA 2 - Distribuição dos tipos de elementos SCCmec entre <i>S. aureus</i> e SCN analisados.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Agar Vermelho Congo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de culturas americanas)
BAB	<i>Blood Agar Base</i> (Agar base sangue)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Agar infusão de cérebro e coração)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de busca e alinhamento local)
CA-MRSA	<i>Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirido na comunidade).
<i>ccr</i>	<i>cassette chromosome recombinase</i> (cassete de recombinação cromossômica).
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de controle e prevenção de doenças)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de padronização clínica e laboratorial).
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HA-MRSA	<i>Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirido em hospitais).
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IS	Segmento de inserção
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
MHA	Agar Müeller Hinton
MRS	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus</i> (<i>Staphylococcus</i> resistentes a meticilina).
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina).
MRSCN	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus Coagulase Negative</i> (<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo resistente à meticilina).
MSSA	<i>Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina).
ORF	Open Reading Frame (Quadro Aberto de Leitura)
pb	Pares de bases
PBP2a	<i>Penicilin Binding Protein 2 alternative</i> (Proteína de Ligação a Penicilina 2 alternativa)
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PCT	Placa de cultura de tecido
PNAG	<i>Polymeric N-acetil Glucosamin</i> (N-acetil glucosamina polimérica).
PVL	<i>Panton-Valentine Leucocidin</i> (Leucocidina de Panton Valentine).
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase usando Transcriptase reversa
SaPI	Ilha de Patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> (Ilhas de patogenicidade estafilocócica)
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>).
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
TSST	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina com resistência intermediária
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 O gênero <i>Staphylococcus</i>	17
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.1.2 <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo.....	19
3.2 Fatores de virulência.....	19
3.2.1 Ilhas de patogenicidade.....	19
3.2.2 Exotoxinas.....	20
3.2.3 Superantígenos	21
3.2.4 Biofilme.....	22
3.4 Resistência antimicrobiana.....	23
3.4.1 Bases moleculares da resistência à β -lactâmicos.....	24
3.4.2 Cassete Cromossômico estafilocócico: <i>SCCmec</i>	26
3.4.3 Origem e reservatório do <i>SCCmec</i>	31
3.4.4 Infecções HA-MRSA versus CA-MRSA.....	32
3.4.5 Diagnóstico fenotípico e molecular de cepas meticilina resistente.....	33
REFERÊNCIAS.....	35
4 ARTIGOS.....	41
4.1 Artigo 1 - Prevalência de genes de virulência em amostras nosocomiais de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo.....	42
4.2 Artigo 2 - Produção de biofilme e presença dos genes <i>icaAD</i> em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp associados a infecção hospitalar.....	56
4.3 Artigo 3 - Diversidade de elementos <i>SCCmec</i> em amostras nosocomiais de <i>Staphylococcus</i> spp em Recife, Pernambuco, Brasil.....	76

1. INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* spp, embora estejam colonizando pele e mucosa de seres humanos e outros animais, comportam-se como patógenos oportunistas responsáveis por complicações infecciosas, utilizando diferentes mecanismos que facilitam a invasão e evasão do sistema imune, no organismo do hospedeiro.

Entre as espécies patogênicas humanas, o *Staphylococcus aureus* destaca-se por apresentar vários fatores de virulência e possuir diferentes mecanismos de aquisição de resistência aos antimicrobianos. Os *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN) embora possuam um estilo de vida comensal ou saprofítico, tem emergido como um importante patógeno humano, devido a sua implicação em numerosos casos de infecções em âmbito hospitalar, especialmente às associadas a biomateriais implantados, e na comunidade.

A aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos vem constituindo um grande desafio no tratamento e controle das infecções estafilocócicas. A resistência à meticilina é particularmente preocupante, uma vez que inviabiliza a terapia com qualquer outro antibiótico da classe dos β -lactâmicos. Os estafilococos meticilina resistentes têm sido o principal responsável por infecções no ambiente hospitalar, conhecidos como HA-MRS (*Hospital Acquired–Methicillin Resistance Staphylococcus*) e com infecções não relacionadas à hospitalização, ditas da comunidade e nomeados como CA-MRS (*Community Acquired-Methicillin Resistance Staphylococcus*).

Cepas HA-MRS são epidemiologicamente e clinicamente diferentes de cepas CA-MRS. Isso porque as cepas HA-MRS são geralmente multidroga resistentes, enquanto que as cepas CA-MRS possuem resistência a um limitado número de drogas. Além das cepas CA-MRS carregarem diferentes tipos de genes de virulência.

Amostras de *Staphylococcus* spp apresentando resistência à meticilina e responsáveis por complicações infecciosas decorrente da expressão dos seus mecanismos de virulência são frequentemente isoladas em hospitais da cidade de Recife. Contudo, os estudos referentes aos aspectos moleculares dessa resistência e virulência são escassos. O presente trabalho estudou mecanismos de patogenicidade e de resistência à meticilina em isolados de *Staphylococcus* spp oriundos de processos infecciosos nosocomiais de um hospital universitário da cidade de Recife, afim de aprofundar a compreensão sobre o tema.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar relevantes aspectos da patogenicidade e resistência à meticilina através de métodos fenotípicos e moleculares em isolados de *Staphylococcus* spp associadas à infecção hospitalar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar os genes de virulência *hlgCB*, *lukSF* e *tst* que codificam γ -toxina leucocidinas e toxina do choque tóxico, respectivamente, em isolados de *S. aureus* e SCN resistentes à meticilina.
2. Investigar a presença dos genes *icaA* e *icaD* e comparar com a expressão através da habilidade em produzir biofilme.
3. Determinar o tipo de *SCCmec* e avaliar a susceptibilidade à oxacilina comparando com a expressão de PBP2a.

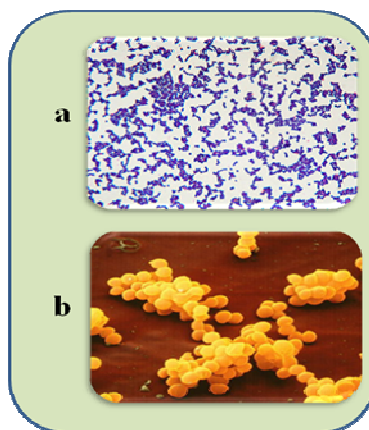
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* faz parte da família Staphylococcaceae e compreende atualmente 47 espécies e 24 subespécies. São comuns na natureza, considerados comensais presente em glândulas da pele e mucosa de mamíferos e aves. Fazem parte da microbiota humana, embora, sejam responsáveis por infecções oportunistas significativas (EUZEBY, 2012).

Em esfregaços de material biológico corado pelo método de Gram, os estafilococos apresentam-se como cocos gram-positivos de aproximadamente 1µm de diâmetro (figura 1a), que podem estar isolados ou aos pares, mas na maioria das vezes agregados formando estruturas em forma de cachos (Figura 1b) (PLATA et al. 2009).

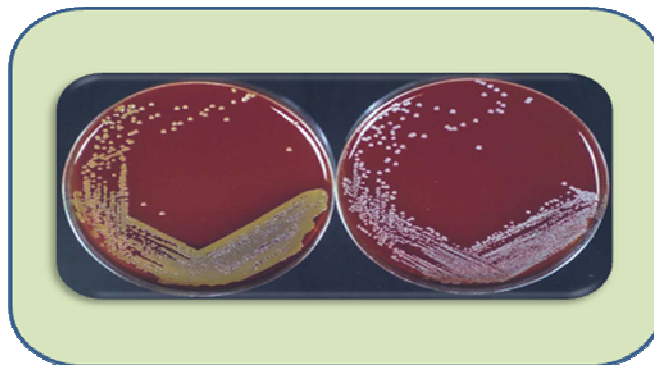
Figura 1 - Características microscópicas do gênero *Staphylococcus*



Fonte: www.sciencephoto.com

Staphylococcus spp não formam esporos, embora possam permanecer viáveis por longos períodos em fômites; crescem em meios comuns como caldo ou ágar simples, pH 7, com temperatura ótima de 37°C. Todos os membros deste gênero formam colônias de aspecto cremoso em ágar nutritivo; as colônias podem apresentar-se douradas ou esbranquiçadas (Figura 2) e em meio ágar sangue de carneiro podem apresentar uma zona hemolítica circundante. A pigmentação dourada é devida à produção de carotenóides que protegem a bactéria da ação oxidante produzida pelo sistema imune do hospedeiro e pode ser considerado um fator de virulência (PLATA et al. 2009).

Figura 2 - Características macroscópicas do gênero *Staphylococcus*. À esquerda: colônias de *S. aureus* produtoras de pigmento dourado. À direita: colônias esbranquiçadas de *S. epidermidis*



Fonte: www.healthhype.com

Os *Staphylococcus* spp são anaeróbios facultativos em sua maioria; a reação da catalase é positiva e a presença da coagulase divide taxonomicamente o gênero em dois grupos: os coagulase positivos, capazes de coagular o plasma sanguíneo, como por exemplo das espécies *Staphylococcus aureus*; e os coagulase negativos que são incapazes de coagular o plasma sanguíneo como por exemplo a espécie *Staphylococcus epidermidis* (BASTOS et al. 2010).

As espécies do gênero apresentam tolerância a altas concentrações de Cloreto de Sódio. O meio ágar manitol-salgado é usado para o crescimento seletivo de *S. aureus*, uma vez que a espécie fermenta o manitol, produzindo ácido lático. Entretanto, o crescimento neste meio é considerado um teste presuntivo e deve ser complementado pelo teste de coagulase em tubo, desde que algumas espécies de SCN também são fermentadoras do manitol (PLATA et al. 2009).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Os *S. aureus* pode tanto manter um comportamento simbiótico com seu hospedeiro sem causar doenças, como agir como patógeno e causar numerosos processos infecciosos que incluem desde infecções cutâneas relativamente simples (celulite, impetigo e abscessos), até doenças sistêmicas potencialmente fatais como a síndrome do choque tóxico e a síndrome da pele escaldada (CASEY et al. 2007; GORDON; LOWY, 2008).

Os *S. aureus* é uma das principais causas de infecções no ambiente hospitalar e na comunidade, com altos índices de morbidade e mortalidade. Embora seu principal habitat seja a nasofaringe, sendo encontrados em cerca de 20-30% de indivíduos sadios, outros sítios também podem ser colonizados como axilas, virilha e trato gastrointestinal (GORDON; LOWY, 2008; LECLERCQ, 2009). Independente da sua capacidade de causar doenças, *S. aureus* é um importante patógeno, devido sua notável habilidade para desenvolver resistência aos antimicrobianos (PLATA et al. 2009).

3.1.2 *Staphylococcus Coagulase Negativo*

Os *Staphylococcus Coagulase Negativos* formam um grande grupo, dentro do gênero, formado por 32 espécies que podem ser categorizados com base na sua susceptibilidade à novobiocina (HUEBNER; GOLDMANN, 1999; VON EIFF et al. 2002) Geralmente não é realizado a identificação dos SCN ao nível da espécie. Isso porque, não há uma clara associação de certas síndromes clínicas específicas a espécie de SCN (HUEBNER; GOLDMANN, 1999).

Os SCN foram por muito tempo considerado simples comensais da pele, sendo reportados como contaminantes externos de hemoculturas durante a coleta de sangue (KLOSS et al. 1994). Entretanto, este grupo vem sendo considerado como patógenos emergentes, reconhecidos como causadores de processos infecciosos de pós-operatório oftalmológico, endocardites de válvulas nativas ou prostéticas, pneumonias, osteomielites e feridas cirúrgicas em infecções hospitalares (LONGAUEROVA, 2006; O'GARA; HUMPHREYS, 2001; VOUNG; OTTO, 2002).

Os SCN são menos virulentos que *S. aureus*, mas podem causar infecções subagudas ou crônicas e sua patogenicidade está principalmente relacionada à capacidade de produzir biofilme (LONGAUEROVA; 2006; VOUNG; OTTO, 2002).

3.2 Fatores de virulência

3.2.1 Ilhas de patogenicidade

As ilhas de patogenicidade estafilocócicas ou SaPIs (do inglês: *Staphylococcal Pathogenicity Islands*) são elementos cromossomais móveis que albergam genes codificantes de toxinas. Já foram identificadas sete famílias conservadas de SaPIs em *S. aureus*: vSa1 (SaPI1 e SaPI3), vSa2 (SaPIbov), vSa3, vSa4 (SaPI2), vSa α , vSa β e vSa γ ; e uma em *S. epidermidis*, vSe γ . O protótipo dessa família, a vSa1, possui genes

codificantes de superantígeno e enterotoxinas. As famílias vSa α e vSa β possuem genes para superantígeno e leucocidinas (GAL-MOR; FINLAY, 2006; GILL et al. 2005; LINDSAY; HOLDEN, 2004; NOVICK, 2003).

Além das ilhas de patogenicidade, há diferentes profagos no genoma do *S. aureus* que albergam vários genes que codificam toxinas. A presença dos genes *int* e de sítios *att* em ilhas de patogenicidade de *S. aureus* apontam para uma íntima relação entre ilhas de patogenicidade e bacteriófagos, indicando que diferentes ilhas nesta espécie têm sido adquiridas na forma de fagos (GORDON; LOWY, 2008; SCHMIDT; HENSEL, 2004,). Baba et al (2002) classificou três profagos, Φ Sa1, Φ Sa2 e Φ Sa3, responsáveis por importantes genes de virulência, a exemplo do Φ Sa2 que transporta o gene *luk*, responsável pela Leucocidina de Panton-Valentine.

3.2.2 Exotoxina

As exotoxinas são proteínas tóxicas produzidas pela célula bacteriana e disseminadas de um determinado sítio de infecção para outras regiões do organismo, onde exercem efeitos danosos (MADIGAN et al. 2010).

As toxinas citolíticas ou citotoxinas são exotoxinas que promovem danos à membrana citoplasmática através da formação de poros, que levam à saída do conteúdo citoplasmático e à lise, resultando em morte celular (PLATA et al. 2009). O *S. aureus* produz quatro citotoxinas conhecidas como hemolisinas: alfa-, beta-, gama- e delta-toxina. A alfa toxina possui ação citotóxica contra leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e eritrócitos humanos, além de ação dermonecrótica que parece envolvida na formação de abscessos, característicos das infecções por *S. aureus* (CUNHA; CALSOLARI, 2008; PLATA et al. 2009). A beta toxina atua contra a esfingomielina da camada externa de fosfolipídios da membrana dos eritrócitos e outras células. Sua atividade hemolítica aumenta após exposição a variações de temperatura, sendo conhecida como hemolisina “quente-fria”. A delta toxina tem ação surfactante sobre a membrana plasmática provocando lise celular e também é capaz de ativar a adenilato ciclase com produção de AMP cíclico, ação particularmente importante nos quadros de diarreia por estafilococos (CUNHA; CALSOLARI, 2008). Alguns isolados de *S. epidermidis* produzem uma delta toxina com alta homologia à delta toxina de *S. aureus* e dotada de atividade citotóxica contra eritrócitos e outras células. A gama toxina, possui ação pró-inflamatória sendo capaz de lisar leucócitos e eritrócitos (CUNHA;

CALSOLARI, 2008). A gama toxina é formada pela combinação de três proteínas codificadas pelo *locus hlgACB* (HlgA, HlgC e HlgB) (FOSTER, 2005).

Além das hemolisinas, *S. aureus* produz leucocidinas, exotoxinas que também exercem efeito tóxico direto sobre a membrana de células do hospedeiro, no caso leucócitos. São descritas três leucocidinas: Leucocidina de Panton Valentine (PVL, do inglês: *Panton-Valentine Leucocidin*), Leucocidina E/D e Leucocidina M/F semelhante à Panton Valentine.

A PVL, assim como as demais leucocidinas, é uma proteína bi-componente, composta por duas proteínas, LukS-PV e LukF-PV, codificadas pelo *locus lukSF*, cujos alvos são células mononucleares e polimorfonucleares humanas. Cerca de 5% dos isolados clínicos de *S. aureus* possuem o gene *luk* (PRÉVOST et al. 1995), estando envolvidos com doenças graves em crianças e adultos jovens sem histórico de hospitalização, geralmente apresentando um quadro de infecção primária de pele, como furunculose que pode evoluir rapidamente, por via hematogênica para pneumonia necrosante (CUNHA; CALSOLARI, 2008; PLATA et al. 2009).

A γ -toxina e a PVL possuem ação sinérgica. As três proteínas da γ -toxina, que apresentam cada uma delas, um peso molecular na faixa de 32 a 35kDa, interagem com uma das duas proteínas de leucocidina (com peso molecular de 32 a 34kDa), formando três combinações possíveis (LukS-PV+HlgB, LukF-PV+HlgA, LukF-PV+HlgC), todas com atividade biológica. (KONEMAN, 2008; LINA et al. 1999).

3.2.3 Superantígenos

Toxinas estafilocócicas denominadas superantígenos constituem um grupo de proteínas imunoestimulatórias relacionadas a processos de gastroenterites e quadros de choque tóxico. São termoestáveis e resistentes à proteases, o que lhes permitem atravessar o trato gastrointestinal sem perder a atividade, especialmente nos casos de doenças transmitidas por alimentos. Essas toxinas formam um complexo unindo as moléculas do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II das células apresentadoras de antígenos e seu respectivo receptor na superfície das células T, mimetizando a apresentação de antígenos realizada pelas células apresentadoras. Este complexo induz a intensa proliferação das células T policlonais, resultando em produção e liberação massiva de citocinas, que desencadeiam uma intensa resposta inflamatória, dano tecidual, extravasamento do conteúdo capilar, hipotensão, congestão de vários órgãos, tetania e choque letal. A função primária desses superantígenos é

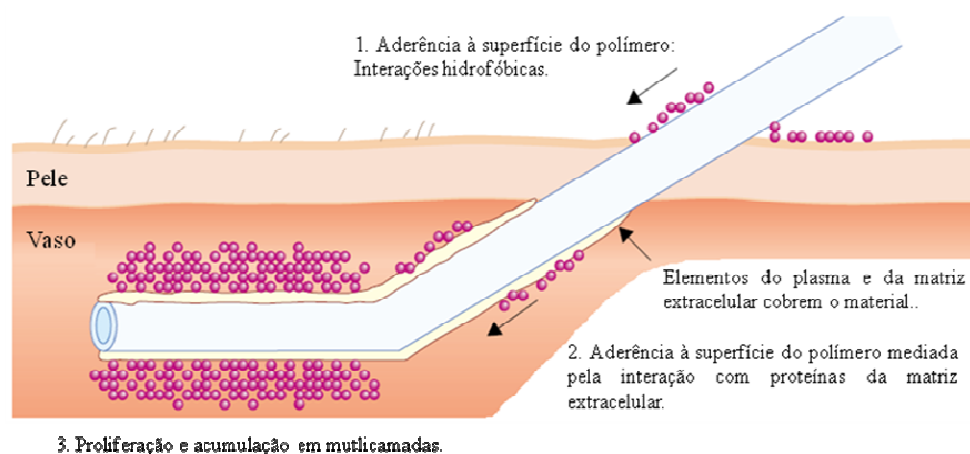
debilitar o sistema imune do hospedeiro, permitindo a propagação do patógeno e o progresso da doença. Nesse grupo de toxinas estão enquadrados diversos tipos sorológicos de enterotoxinas, relacionadas com casos de intoxicação alimentar e a Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), envolvida na Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócica e codificada pelo gene *tst* (CUNHA; CALSOLARI, 2008; PLATA et al. 2009).

3.2.4 Biofilme

Biofilmes bacterianos desempenham um papel importante em diversas infecções crônicas, especialmente aquelas associadas à biomateriais implantados como catéteres, sondas e válvulas cardíacas (APARNA; YADAV, 2008; O’GARA, 2007).

O processo de formação do biofilme requer dois estágios: a adesão da bactéria à superfície inerte e a formação de um agregado celular. Após a inserção no paciente, o biomaterial implantado é rapidamente coberto por plasma e proteínas da matriz extracelular (Figura 3), como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, tromboplastina e fator de von Willebrand, que são reconhecidos por receptores presentes na superfície celular das bactérias iniciando o processo de adesão. Em seguida, ocorre um processo de acumulação celular influenciado por fatores bacterianos e ambientais (VON EIFF et al. 2002).

Figura 3 - Formação do biofilme por estafilococos em um dispositivo médico implantado.



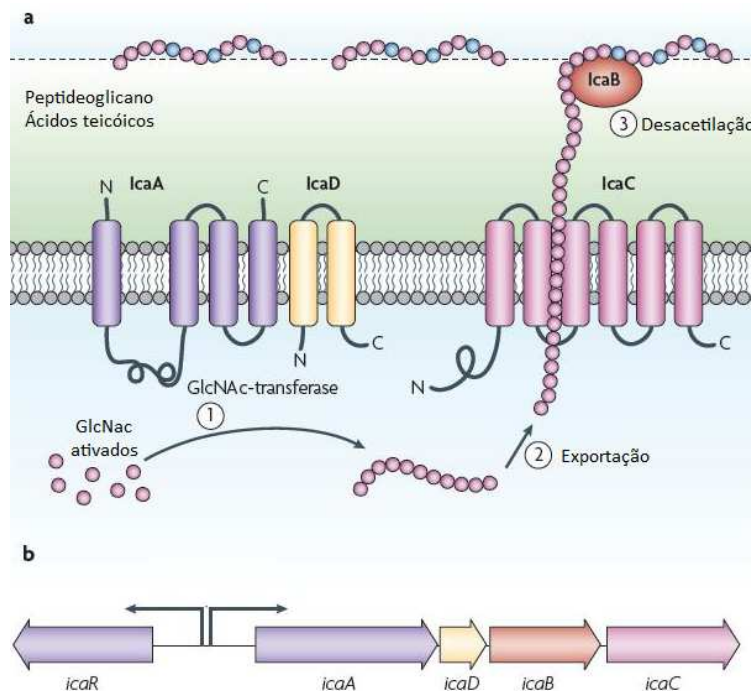
Fonte: VON EIFF et al. 2002 (adaptado).

O mecanismo de acumulação melhor estudado até o presente em estafilococos, está relacionado à produção da Adesina Intercelular Polissacarídica (PIA) ou N-acetil-

glucosamina polimérica (PNAG) codificada pelo operon *icaADBC*. Além da produção da PIA/PNAG, essa acumulação pode ocorrer por meio de uma adesão protéica mediada por proteínas de superfície como a Bap (Proteína Associada ao Biofilme) e Aap (Proteína Associada a Acumulação), mecanismos de aderência e acumulação celular independente do operon *ica* (O’GARA, 2007; VON EIFF et al. 2002).

O operon *icaADBC* foi primeiramente identificado e caracterizado em *S. epidermidis*, sendo formado por quatro genes estruturais responsáveis pela síntese de uma adesina polissacarídica e o gene *icaR*, que atua como regulador negativo da transcrição do locus *icaADBC* (MACK et al. 2007). Na síntese da PIA/PNAG (Figura 4) a proteína IcaA tem atividade de N-acetilglicosaminil-transferase, tendo como substrato os monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNac); IcaD promove a correto dobramento e inserção de IcaA na membrana. A ação conjunta de IcaA e IcaD resulta na formação de oligômeros de GlcNac com cerca de 20 resíduos. IcaC, uma proteína transmembrana, é responsável pelo alongamento dos oligômeros de GlcNac formados e a translocação do polissacarídeo crescente para a superfície celular. IcaB, uma proteína presente na superfície promove a desacetilação da molécula de poli-N-acetilglicosamina formada, inserindo cargas positivas no polímero (PIA) inicialmente neutro, o que garante as propriedades de adesão à superfície, formação de biofilme e evasão imune (O’GARA, 2007; OTTO, 2009; ROHDE et al. 2010).

Figura 4 - O processo de síntese do polímero PIA. (a): Adesina Intercelular Polissacarídica produzida e formada por suas cadeias de GlcNac; (b): Esquema do operon *icaADBC* envolvido na produção de PIA e do gene *icaR* que codifica uma proteína regulatória.



Fonte OTTO, 2009 (adaptado).

3.4 Resistência antimicrobiana

No início da década de 1960 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, conhecidos como cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina), foram identificados em hospitais britânicos pela primeira vez. Essas cepas espalharam-se rapidamente, atingindo proporções epidêmicas no Norte da Europa em meados da década de 1970, mais tarde invadindo a Europa Meridional, EUA, Austrália e o Extremo Oriente (LENCASTRE et al. 2007) e no início dos anos 1990 alcançam a América Latina (RODRÍGUEZ-NORIEGA et al. 2010).

Com a adoção de rígidas políticas de controle de infecção hospitalar, a frequência de cepas hospitalares MRSA (HA-MRSA) diminuiu em alguns países, mas começaram a disseminar-se na comunidade (CA-MRSA) (LENCASTRE et al. 2007). Com o surgimento das isoxazolilpenicilinas (oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e flucloxacilina) que são estáveis em pH ácido e apresentam alto índice de ligação às proteínas plasmáticas (80%), a meticilina deixou de ser utilizada em muitos países, inclusive no Brasil. A expressão “meticilina-resistente” ou a sigla MRS continua sendo utilizada, para designar as cepas de *Staphylococcus* que não respondem ao tratamento com oxacilina e, por extensão, com as demais isoxazolilpenicilinas (AMATO NETO et al. 2000).

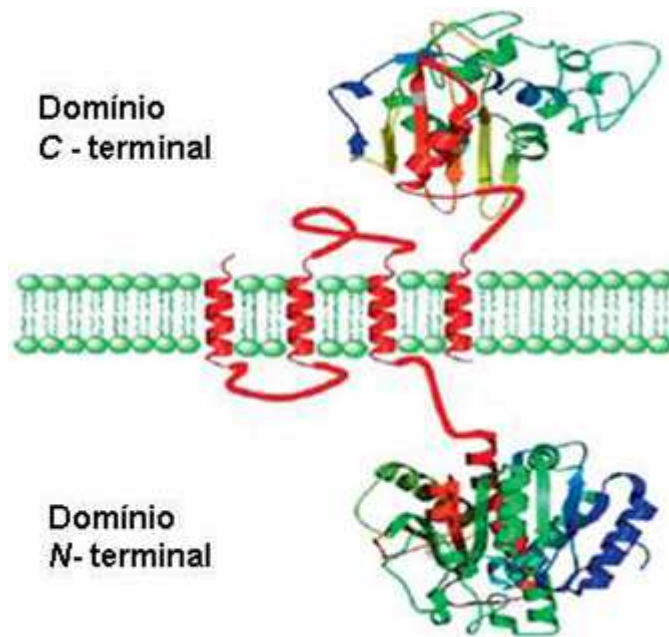
A resistência à oxacilina determinou o aumento indiscriminado de glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), para terapia empírica e profilaxia de infecções hospitalares estafilocócicas, o que teve como consequência o surgimento de cepas resistentes à vancomicina. A primeira cepa com sensibilidade reduzida à vancomicina (VISA) foi isolada em 1997 no Japão, (HIRAMATSU et al. 1997; McDONALD et al. 1997) e com resistência plena à vancomicina (VRSA) foi isolada em 2002 nos EUA (MARTINS; CUNHA, 2007).

3.4.1 Bases moleculares da resistência aos β -lactâmicos

Os estafilococos possuem dois mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, o primeiro, é controlado pelo operon plasmidial *blaZ* (*blaR1* – *blaI* – *blaZ*) que codifica a enzima β -lactamase, a qual atua hidrolisando o antibiótico no meio extracelular; o segundo mecanismo é controlado pelo operon cromossomal *mec* (*mecR1* – *mecI* – *mecA*) responsável pela síntese de uma proteína de ligação a penicilina alternativa (PBP2a ou PBP2'), com baixa afinidade ao antibiótico (FUDA et al. 2005).

A expressão de β -lactamase e PBP2a tem início com a ligação do antibiótico (β -lactâmico) no sítio ativo do domínio penicilina ligante da proteína BlaR1 e/ou MecR1 (figura 5). Ambas são proteínas transmembranas codificadas pelos genes *blaR1* e *mecR1* respectivamente e possuem dois importantes domínios: um domínio *N*-terminal de aproximadamente 38 kDa intracitoplasmático e um segundo domínio, *C*-terminal de aproximadamente 27 kDa, extracitoplasmático que atua como um sensor na superfície da membrana (FUDA et al., 2005). O evento inicial para expressão de resistência é a presença do antibiótico no meio o qual reage com o sítio ativo do domínio *C*-terminal da proteína. A ligação do antibiótico, estimula uma mudança conformacional e uma discreta clivagem auto-proteolítica no domínio *N*-terminal (ARCHER; BOSILEVAC, 2001; ZHANG et al. 2001; FUDA et al. 2005).

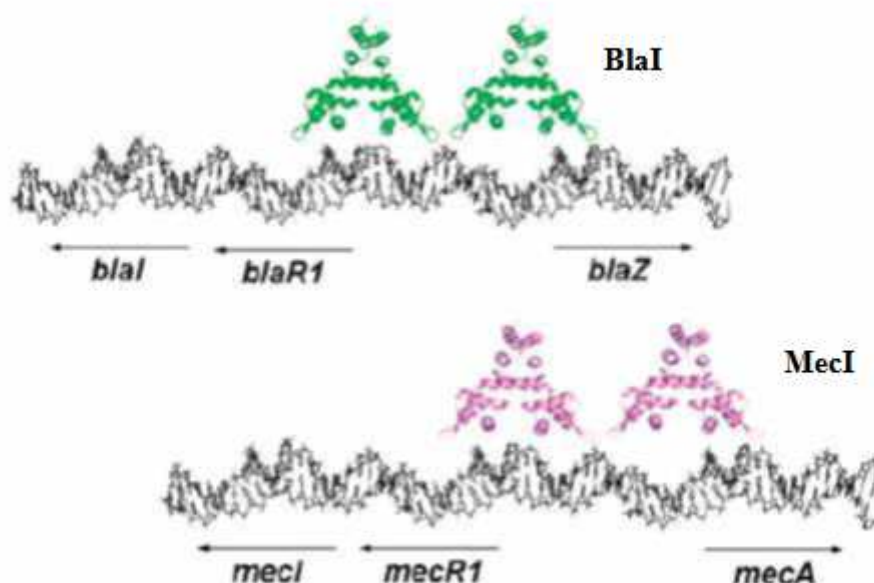
Figura 5 - Representação esquemática das proteínas BlaR1 e/ou MecR1, envolvidas na regulação de β -lactamase e PBP2a, respectivamente.



Fonte: FUDA et al. 2005 (adaptado)

O passo final é a clivagem por metaloproteases, ativadas pelo processo de proteólise, da proteína repressora BlaI e/ou MecI (Figura 6) em fragmentos incapazes de formar dímeros e se ligar ao DNA. Ambas as proteínas possuem peso molecular de 14 kDa. Sem a ação repressora de BlaI e MecI a transcrição do gene estrutural é liberada para produção de β -lactamases ou PBP2a (ARCHER; BOSILEVAC, 2001; FUDA et al. 2005; ZHANG et al. 2001).

Figura 6 - Representação esquemática das proteínas BlaI e MecI envolvidas na expressão de β -lactamase e PBP2a, respectivamente.



Fonte: CHA et al. 2007 (adaptado)

3.4.2 Cassete cromossômico estafilocócico: SCCmec

O cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, do inglês: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) é um elemento genético móvel, considerado uma ilha genômica de resistência presente em estafilococos (HIRAMATSU et al. 2001). Esse elemento está localizado em um sítio específico do cromossomo (*attBSCC*), próximo a origem de replicação. O *attBSCC* está localizado a montante de uma ORF de função desconhecida, denominada *orfX*, a qual é bem conservada nos *Staphylococcus*. Esta localização confere uma importância estratégica para transcrição imediata deste elemento e de genes de resistência aos antimicrobianos (HIRAMATSU et al. 2002).

A organização estrutural e o conteúdo genético dos elementos SCC*mec* são variados, tendo sido caracterizados onze tipos de SCC*mec*, mostrados na tabela 1 (IWG-SCC, 2009; ZONG et al. 2011). Os SCC*mec* tipos I, IV, V, VI e VII (os menores cassetes) não carregam nenhum gene de resistência além do *mecA* (com exceção das variantes IA, IVA e IVC), enquanto que os tipos II e III abrigam genes de resistência a múltiplos antibióticos e a metais pesados, devido a incorporação de plasmídios (pUB110, pl258 e pT181) e transposons (Tn554 e ψ Tn554) que carregam genes de resistência a eritromicina (*ermA*), estreptomicina (*spc*), kanamicina, tobramicina

(*aadD*), bleomicina (*ble*), tetraciclina (*tetK*), cádmio (*cad*) e mercúrio (*mer*) (DEURENBERG; STOBBERING, 2008; ITO et al. 2001). Além disso, os cassetes possuem uma relação epidemiológica, estando os SCC*mec* tipos I, II e III relacionados com isolados de origem hospitalar e os tipos IV, V, VI e VII com isolados de origem comunitária (DEURENBERG; STOBBERING, 2008; KATAYAMA et al. 2001).

Tabela 1 - Tipos de SCC*mec* identificados

SCC <i>mec</i>	Complexo <i>mec</i>	Complexo <i>ccr</i>
Tipo I	Classe B	<i>ccrAB1</i>
Tipo II	Classe A	<i>ccrAB2</i>
Tipo III	Classe A	<i>ccrAB3</i>
Tipo IV	Classe B	<i>ccrAB2</i>
Tipo V	Classe B-E	<i>ccrC</i>
Tipo VI	Classe B	<i>ccrAB4</i>
Tipo VII	Classe C	<i>ccrC2</i> , <i>ccrC8</i>
Tipo VIII	Classe A	<i>ccrAB4</i>
Tipo IX	Classe C2	<i>ccrAB1</i>
Tipo X	Classe C1	<i>ccrA1B6</i>
Tipo XI	Classe E	<i>ccrA1B3</i>

O SCC*mec* pode ser dividido em tipos e subtipos. O tipo do SCC*mec* é definido baseado na organização de dois sítios genéticos: o complexo *mec* e o complexo *ccr* (Tabela 1). O complexo *mec* é responsável pela expressão da proteína PBP2a. Até o presente, foram descritos cinco classes de complexos *mec* (Tabela 2). O complexo *mec* classe A é o protótipo de complexo *mec*, formado pelo gene *mecA*, os reguladores (*mecR1* e *mecI*), uma região hipervariável (HVR) e a IS431. Nos demais complexos *mec* (B-E), o gene *mecI* e/ou o gene *mecR1* estão parcialmente ou completamente deletados, substituídos por sequências de inserção (IS) como as IS1272 e IS431 (ITO et al. 2001; IWG-SCC, 2009; KATAYAMA et al. 2001).

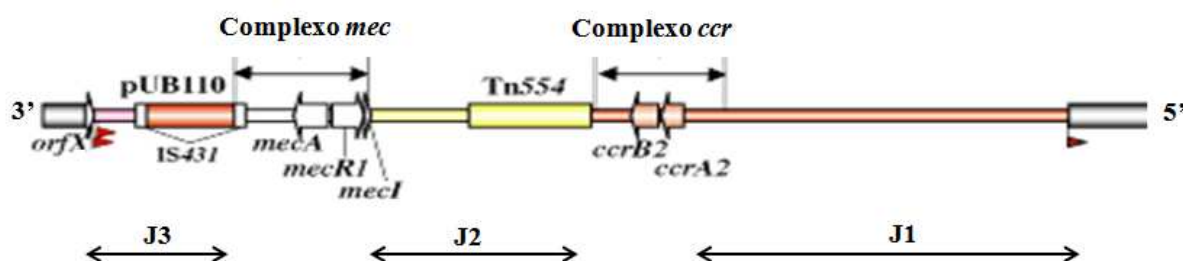
Tabela 2 - Classes do complexo *mec*

Classe	Estrutura
A	<i>mecI-mecR1-mecA-IS431</i>
B	<i>IS1272-Δ<i>mecR1</i>-mecA-IS431</i>
C	<i>IS431-Δ<i>mecR1</i>-mecA-IS431</i>
D	<i>Δ<i>mecR1</i>-mecA-IS431</i>
E	<i>Δ<i>mecR1</i>-mecA-IS431</i>

O complexo *ccr* codifica recombinases da família invertase/resolvase responsáveis pela integração e excisão precisa do SCC*mec* inteiro (HANSEN; ERICSON, 2006). Até o presente são conhecidos cinco tipos de complexo *ccr* (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* e *ccrC*).

Além desses dois complexos, o SCC*mec* possui regiões denominadas de regiões J ou “Junkyard” (figura 7). Todos os SCC*mec* possuem três regiões J, que foram primeiramente designadas como L-C, C-M e I-R, sendo depois referidas como região J1 (L-C), localizada entre a junção à direita do cassete e os genes *ccr*; região J2 (C-M) entre os genes *ccr* e o complexo *mec* e a região J3 (I-R) entre o complexo *mec* e a *orfX* situada na porção 3’ terminal do cassete. Essas regiões podem albergar genes de resistência a outras classes de antibióticos, além de outros elementos não essenciais ao cassete (DEURENBERG; STOBBERING, 2008; IWG-SCC, 2009; HIRAMATSU et al. 2002).

Figura 7- Representação esquemática do elemento SCC*mec*, ressaltando as regiões J1, J2 e J3, o complexo *mec* e *ccr*.



Fonte: www.staphylococcus.net, adaptado.

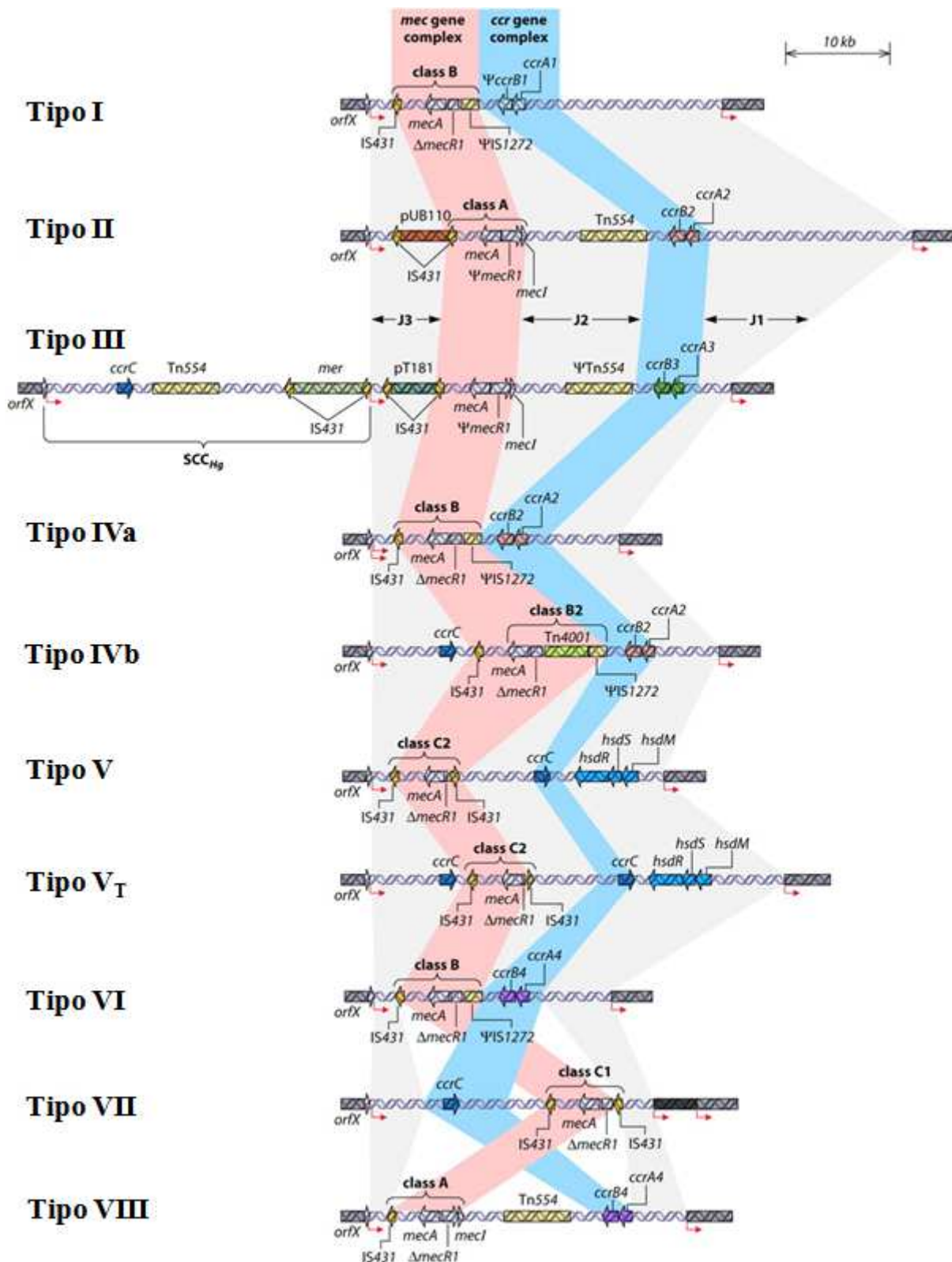
A subtipagem dos tipos de SCC*mec* tem sido realizada baseado no polimorfismo ou variação apresentados pela região J. A tabela 3 e a figura 8, apresentam os principais tipo de SCC*mec* e as diferenças na região J que levam a subtipagem.

Tabela 3 - Principais elementos SCC*mec* identificados em *Staphylococcus* spp.

SCC <i>mec</i>		Complexos		Principal diferença presente na região J
Tipo	Subtipos	<i>ccr</i>	<i>mec</i>	
I	IA	1	B	pUB110 integrado a região posterior ao gene <i>mecA</i>
II	IIA	2	A	SCC <i>mec</i> tipo IVb
	IIB	2	A	SCC <i>mec</i> tipo IVb, ausência do Tn554
	IIC	2	A	SCC <i>mec</i> tipo IVb, ausência de ORF's entre Tn554 e complexo <i>mec</i>
	IID	2	A	SCC <i>mec</i> tipo IVb, ausência de pUB110 e IS431 na junção esquerda.
	IIE	2	A	SCC <i>mec</i> tipo IVb, ausência da região entre Tn554 e complexo <i>mec</i> , ausência da região entre pUB110 e IS431 na junção esquerda
	IIf	2	A	Ausência de pUB110; IS256 inserida <i>upstream</i> o gene <i>mecA</i>
III	III	3	A	Presença do pT181
	IIIA	3	A	Ausência de pT181 e suas IS431
	IIIB	3	A	Ausência de pT181e pT258, junto com suas IS431; ausência do Tn554
IV	IVa	2	B	Região J1 diferente; presença de <i>dcs</i>
	IVb	2	B	Região J1 diferente; presença de <i>dcs</i>
	IVc	2	B	Região J1 diferente; presença de Tn4001 flanqueando por IS256
	IVd	2	B	Região J1 diferente
	IVA	2	B	pUB110 integrado na região posterior do gene <i>mecA</i>
	IVE	2	B	Variante do IVc; ausência da região <i>dcs</i> ; região J3 diferente
	IVF	2	B	Variante do IVd; ausência da região <i>dcs</i> ; região J3 diferente
	IVg	2	B	Região J1 diferente composta por 5 ORF's
	IVh	2	B	Região J1 diferente; característico do clone ST22-MRSA-IV

dcs, segmento constante posterior;

Figura 8 - Estrutura dos principais SCCmec.



Fonte: DAVID; DAUM, 2010 (Modificado).

3.4.3 Origem e reservatório do SCCmec

A origem do SCCmec ainda não está elucidada. Alguns estudos sugerem que o reservatório do cassete ou sua origem estão em espécies relacionadas; Couto et al. (1996) encontraram um homólogo ao gene *mecA* (apresentando 88% de similaridade) em *Staphylococcus sciuri*; Wielders et al. (2001), observaram a transferência horizontal do gene *mecA*, *in vivo*, de *S. epidermidis* para *S. aureus*, durante antibioticoterapia e mais recentemente, Baba et al. (2009), relataram que *Macrococcus caseolyticus* está intimamente relacionado com a origem da resistência à metilina em *S. aureus*.

Outros estudos buscam por meio de técnicas de epidemiologia molecular estabelecer relações e assim encontrar ou explicar a origem do SCCmec. Robinson e Enright (2003) propuseram uma rota evolutiva baseado nos resultados das análises pela técnica de MLST (*Multi Locus Sequence Type*) segundo a qual um pequeno número de clones pandêmicos de MRSA seria responsável pela maioria das infecções. Estes clones representam linhagens que obtiveram sucesso em termos de habilidade em causar infecções, adaptar-se a mudanças de ambiente clínico, persistir e se disseminar entre distintas áreas geográficas, inclusive entre continentes. Esses clones de MRSA foram sendo denominados com o nome da região na qual foram primeiramente identificados (Ibérico, Brasileiro, Húngaro, Nova Iorque/Japão e Pediátrico Epidêmico) ou segundo alguma propriedade epidemiológica característica de determinada linhagem (OLIVEIRA et al. 2002; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al. 2010).

O clone Ibérico foi primeiramente encontrado na Espanha, em 1989, e disseminou-se na Europa e nos EUA. O clone Brasileiro foi detectado entre 1992-1993 na cidade de São Paulo (SADER et al. 1994) espalhando-se por hospitais brasileiros da região norte até o sul do País e atualmente encontra-se amplamente distribuído por várias regiões do mundo, incluindo outros países da América Latina (Argentina, Chile e Uruguai) e da Europa (República Tcheca e Portugal) (MARTINS; CUNHA, 2007). O clone Nova Iorque/Japão é considerado o clone de MRSA predominante em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque e algumas regiões adjacentes, mas também foi encontrado em hospitais do Japão. O clone Pediátrico descrito em hospitais pediátricos de Portugal em 1992 foi depois encontrado na Polônia, EUA, Argentina e Colômbia (OLIVEIRA et al. 2002).

A estrutura do elemento *mec* presente nos clones endêmicos, está relacionada com o tipo de SCCmec: o clone Ibérico carrega o SCCmec tipo I e IA; o clone Nova York/Japão carrega o SCCmec tipo II; os clones Brasileiro e Húngaro carregam os

SCCmec tipo III e IIIA, e o clone Pediátrico o SCCmec tipo IV (OLIVEIRA et al. 1998).

3.4.4 Infecções HA-MRSA versus CA-MRSA

A disseminação de microrganismos resistentes depende de vários fatores que incluem a expansão do espectro de resistência devido a mutações; troca genética entre microrganismos; pressão seletiva do ambiente hospitalar e na comunidade facilitando o desenvolvimento e a proliferação de clones bacterianos resistentes; e a inabilidade de alguns testes laboratoriais para detectar o aumento de fenótipos de resistência (TENOVER, 2001).

Tradicionalmente, infecções por *Staphylococcus* resistentes à meticilina eram adquiridas exclusivamente em âmbito hospitalar e nomeadas como HA-MRSA. Alguns fatores contribuem para colonização ou infecção por isolados resistentes, como a exposição a terapias antimicrobianas, o longo tempo de internamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), procedimentos cirúrgicos, procedimentos invasivos e exposição a pacientes já colonizados. Geralmente os microrganismos são introduzidos em uma instituição por meio de um paciente colonizado ou um membro da equipe hospitalar e a transmissão se dá por contato direto principalmente através das mãos destes portadores ou através de equipamentos e utensílios manipulados por pessoas colonizadas por MRSA (CHAMBERS, 2001; KLUYTMANS et al. 1997;).

Uma mudança na epidemiologia dessas infecções foi observada a partir de 1989-1990 com um surto de CA-MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Adquirido na Comunidade) no sudoeste do Pacífico (Austrália, Nova Zelândia e Samoa) e Europa (França, Suíça e Holanda) (GORDON; LOWY, 2008; VANDENESCH et al. 2003). No final dos anos 1990 ocorreram casos de infecções graves por MRSA, em crianças saudáveis sem fatores de risco, nos EUA. Todos os casos, associados com pneumonia necrosante ou abscesso pulmonar e sepsi, relatados em crianças, foram rapidamente fatais. O isolado responsável pelo surto ficou conhecido como *S. aureus* USA-400. Subsequentemente, surtos de infecções de pele e tecidos moles causados por CA-MRSA foram novamente descritos na comunidade principalmente entre grupos restritos (prisioneiros, soldados e atletas, particularmente jogadores de futebol americano). Estes novos surtos foram associados à cepa USA-300 (PHILIP; COHEN, 2007, GORDON; LOWY, 2008). Ambos os clones, *S. aureus* USA-400 e USA-300, permanecem responsáveis por vários processos infecciosos na comunidade (CHAMBERS; DELEO, 2009).

Em geral os clones CA-MRSA são mais virulentos e carregam SCCmec tipos IV e V considerados os menores cassetes. Possivelmente devido ao tamanho pequeno esses cassetes são mais fáceis de serem mobilizados. Em contrapartida, os CA-MRSA apresentam elevada sensibilidade a outras classes de antibióticos, como trimetoprim-sulfametazona, clidamicina, fluorquinolonas, gentamicina, eritromicina e tetraciclina (SKRUPKY et al. 2009).

O número de infecções por CA-MRSA ainda é crescente atingindo unidades de saúde e diminuindo a fronteira entre cepas comunitárias e hospitalares (GORDON; LOWY, 2008). Adicionalmente, também tem sido encontrado SCN albergando esses cassetes e associado a infecções na comunidade (ITO et al. 2004; HISATA et al. 2005).

A maioria das infecções por CA-MRSA inicia-se como simples infecções de pele que evoluem rapidamente, por via hematogênica, para infecções fulminantes provavelmente devido a fatores de virulência como a Leucocidina Pantón-Valentine. Essas cepas são carreadoras de profagos como o Φ Sa2 que abriga os genes *lukS*-PV e *lukF*-PV, e o profago Φ Sa3 que codifica estafiloquinase e inibidores do sistema complemento (CHAMBERS; DELEO, 2009; DEURENBERG; STOBBERING, 2008). Há uma forte relação epidemiológica entre cepas CA-MRSA e a Leucocidina Pantón-Valentine; enquanto o gene *luk* ocorre em 1-10% das cepas de origem clínica, cerca de 70-80% das cepas associadas a pneumonias adquiridas na comunidade possuem o gene *luk*. Desta forma é comum associar a presença da Leucocidina Pantón-Valentine à cepas SCCmec tipo IV ou V (GORDON; LOWY, 2008).

3.4.5 Diagnóstico fenotípico e molecular de cepas meticilina resistente

O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) considera os testes moleculares para observar a presença do gene *mecA* e/ou a expressão da proteína alternativa de ligação à penicilina (PBP2a), como os testes mais sensíveis na identificação de isolados meticilina resistentes (CLSI, 2010)

Para detecção rotineira da resistência à meticilina os testes de disco-difusão utilizando oxacilina são os mais largamente utilizados. No entanto o CLSI recomenda a utilização de outros testes, como disco-difusão utilizando cefoxitina e semeio em ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/ ml de oxacilina (*screen agar*). Esses métodos podem e devem ser utilizados como confirmatórios e/ou adjuvantes em

isolados nos quais o padrão de susceptibilidade é duvidoso ou de difícil diagnóstico (MIMICA; MENDES, 2007).

Ainda assim, a determinação fenotípica pode ser de difícil interpretação pelo padrão de resistência dos microrganismos. No padrão homogêneo todas as colônias expressam resistência à metilina e não há dificuldade de interpretação do teste, mas no padrão heterogêneo, somente uma fração das colônias expressa resistência à oxacilina, apesar da presença do gene *mecA* (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Quando duas subpopulações coexistem na mesma cultura, as cepas apresentando baixo nível de resistência podem não ser detectadas e estas cepas apesar de possuírem a informação genética, apresentam *in vitro* o fenótipo de sensibilidade (MURAKAMI et al. 1991).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o padrão ouro na detecção molecular de cepas metilina resistente. Protocolos baseados em variações da PCR têm sido desenvolvidos visando aumentar o limiar de detecção e amplificação de mais de um gene em uma mesma reação. Os genes alvo podem ser genes de resistência a diferentes antimicrobianos, genes de virulência e/ou genes espécie-específica para identificação bacteriana (MARKOULATOS et al. 2002; MARTINS; CUNHA, 2007). Assim, em uma mesma reação (Multiplex-PCR), é possível identificar, avaliar a resistência e a virulência do microrganismo, assim como para identificar e tipar o elemento *SCCmec*.

REFERÊNCIAS

- AMATO NETO, V. et al. Antibióticos na prática médica 5 ed. Editora Rocca, 2000.
- APARNA, M.S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, Bahia, v.12, p.526-530, 2008.
- ARCHER G.L.; BOSILEVAC J.M. Signaling antibiotic resistance in *Staphylococci*. **Science**, v.291, p.1915-1916, 2001.
- BABA T., et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **Lancet**, v. 359, p. 1819–1827, 2002
- BABA, T. et al. Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JCSC5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.191, n.4, p.1180–90, 2009.
- BASTOS, M.D.C.D.F.; COUTINHO, B.G.; COELHO, M.L.V. Lysostaphin: a Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. **Pharmaceuticals**, Suíça, v.3, n.4, p.1139–1161, 2010.
- CASEY, A.L.; LAMBERT, P.A.; ELLIOTT, T.S.J. Staphylococci. **International Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.29, p.S23-S32, 2007.
- CHAMBERS H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.7, n.2, p.178-182, 2001.
- CHAMBERS, H.F.; DELEO, F.R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.629-641, 2009.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th informational supplement, M100-S17. CLSI, Wayne, Pa
- COUTO, I. et al. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. **Microbiology Drug Resistant**, Nova York, v.2, p.377-391, 1996.
- CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology Insights**, v. 1, p. 13-24, 2008.
- DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and clinical consequence of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616-687, 2010.
- DEURENBERG, R.H., STOBRENGER, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection Genetics and Evolution**, v. 8, p. 747-763, 2008.
- EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592,

1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>, atualizado agosto de 2012).

FOSTER, T.J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews**, v. 3, p. 948-958, 2005.

FUDA, C.C.S., FISHER, J.F., MOBASHERY, S. β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular life Sciences**, v. 62, p. 2617-2633, 2005.

GAL-MOR, O., FINLAY, B.B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1707-19, 2006.

GILL, S.R., FOUTS, D.E., ARCHER, G.L., MONGODIN, E.F., DEBOY, R.T., RAVEL, J., PAULSEN, I.T., et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n.7, p. 2426-2438, 2005.

GORDON, R.J., LOWY, F.D. Pathogenesis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Infections Diseases**, v. 46, p. 350-359, 2008.

HANSEN, A.M., ERICSON, S.J.U. SCCmec in staphylococci: genes on the move. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 8-20, 2006.

HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 1997.

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

HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., YUZAWA, H., ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Institute Journal Medical Microbiology**, v. 292, p. 67-74, 2002.

HISATA, K., KUWAHARA-ARI, K., YAMANOTO, M., ITO, T., NAKATOMI, Y., CUI, L., BABA, T., TERASAWA, M., SOTOZONO, C., KINOSHITA, S., YAMASHIRO, Y., HIRAMATSU, K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3364-3372, 2005.

HUEBNER, J., GOLDMANN, D.A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annual Review of Medicine**, v. 50, p. 223-36, 1999.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) Guidelines for

Reporting Novel SCCmec elements. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 4961-4967, 2009.

ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K., MORI, N., TSUTSUMIMOTO, K., TIENSASITORN, C., HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 323-1336, 2001.

ITO, T., MA, X.X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 2637-2651, 2004.

KATAYAMA, Y., TERUYO, I., HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical Staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 1955-1963, 2001.

KLUYTMANS, J., van BELKUM, A., VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 505-520, 1997.

KONEMAN, E.W. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª edição, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, cap.12, p. 626, 2008.

LECLERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 3, p. 224-231, 2009.

LENCASTRE, H., OLIVEIRA, D., TOMASZ, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 428-435, 2007.

LINA, G., PIÉMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., P., MARIE-ODILE, GAUDUCHON, V., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin- producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical Infections Disease**, v. 29, p. 1128-1132, 1999.

LINDSAY, J.A., HOLDEN, M.T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 378-385, 2004.

LONGAUEROVA, A. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. **Bratisl Lek Listy**, v. 107, p. 488-452, 2006.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. Interações dos micro-organismos com o homem. In: Microbiologia de Brock. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 28, p.811-838, 2010.

MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., MONCANY, M. Multiplex polymerase Chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, p. 47-51, 2002.

MARTINS, A., CUNHA, M.L.R.S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology and Immunology**, v. 51, p. 787-795, 2007.

MCDONALDS, L.C., KUEHNERT, M.J., TENOVER, F.C., JARVIS, W.R. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources and public health implications. **Emerging Infections Diseases**, v. 3, p. 331-317, 1997.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MURAKAMI, K., MINAMIDE, W., WADA, K., NAKAMURA, E., TERAOKA, H., WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2240-2244, 1991.

NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 1429-1449, 2003.

O'GARA, J.P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p.179-188, 2007.

O'GARA, J.P., HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2001.

OLIVEIRA, D.C., SANCHES, I.S., MATO, R. Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the "Iberian" and the "Brazilian" clones of MRSA. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 4, p. 373-384, 1998.

OLIVEIRA, D.C., TOMASZ, A., LENCASTRE, H. Secrets of success of human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 180-189, 2002.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews**, v. 7, p. 555-567, 2009.

PHILIP, R., COHEN, M.D. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a reviews of epidemiology, clinical features, management and prevention. **International Journal of Dermatology**, v. 46, p. 1-11, 2007.

.

PLATA, K., ROSATO, A. E., WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597-612, 2009.

ROBINSON, D.A., ENRIGHT, M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 3926–3934, 2003.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., SEAS, C., GUZMÁN-BLANCO, M., MEJÍA, C., ALVAREZ, C., BAVESTRELLO, L., ZURITA, J., et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 560–6, 2010.

ROHDE, H., FRANKENBERGER, S., ZÄHRINGER, U., MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 103-111, 2010.

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. Resistência bacteriana. Interpretando o antibiograma. Lançamento em 18 de março. Local: Hospital das Clínicas FMUSP. 1º ed. São Paulo: ATHENEU, 1:118. 2005

SADER, H.S., JONES, R.N., SILVA, J.B. Evaluation of interhospital spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infections Control Hospital Epidemiology**, v. 15, p. 320-323, 1994.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 14-56, 2004

SKRUPKY, L.P., MICEK, S.T., KOLLEF, M. H. Bench to bedside review: Understanding the impact of resistance and virulence factors on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 13, n. 5, p. 222, 2009.

TENOVER, F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, n. 5, p. 108-115, 2001.

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

VON EIFF, C., PETERS, G., HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 677-685, 2002.

VOUNG, C., OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481-489, 2002.

WIELDERS, C.L., VRIENS, M.R., BRISSE, S., DE GRAAF-MILTENBURG, L.A., TROELSTRA, A., FLEER, A., SCHMITZ, F.J., VERHOEF, J., FLUIT, A.C. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, p. 1674–75, 2001.

ZHANG, H.Z., HACKBARTH, C.J., CHANSKY, K.M., CHAMBERS, H.F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in *Staphylococci*. **Science**, v. 291, p. 1962-1965, 2001.

ZONG, Z., PENG, C., LU, X. Diversity of *SCCmec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical Isolates. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. 20191, 2011.

4. ARTIGOS

ARTIGO 1

Prevalência de genes de virulência em amostras nosocomiais de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo*

Wagner Luis Mendes de Oliveira^a, Ewerton L. Ferreira^a, Eduarda V. C. Manguiera^a, Marinalda A. Vilela^b, Alzira Almeida^a, Nilma C. Leal^{a,*}.

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ – PE, Campus da UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz / UPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Neste estudo 46 amostras de *Staphylococcus aureus* e 50 de *Staphylococcus Coagulase Negativo* (SCN) de diferentes espécimes clínicos foram analisadas quanto à presença do gene *mecA* relacionado a resistência a meticilina, de genes relacionados à produção de citotoxinas (*hlg* e *luk*) e superantígenos (*tst*). Os resultados revelaram que todas as amostras possuíam o gene *mecA*; o gene *hlgCB* foi encontrado em 93,4% dos *S. aureus* e 46% dos SCN; o *lukSF* em 28,2% dos *S. aureus* e 14% dos SCN e o *tst* em 6,5% dos *S. aureus* e 2% dos SCN. Os resultados do trabalho apontam para um alto potencial toxigênico e de resistência das cepas de *Staphylococcus* spp investigadas. Esta foi a primeira vez que o gene *luk* foi identificado em SCN obtidos de hemocultura. Esse achado significa uma importante aquisição para a espécie e comprova o papel do SCN como patógeno emergente no ambiente hospitalar.

Palavras chaves: *Staphylococcus aureus*, SCN, *hlg*, *luk*, *tst*, *mecA*

1. Introdução

Os *Staphylococcus spp* estão habitualmente presentes na microflora de pele e mucosa humana, podendo causar diversas infecções de espectro e gravidade variados, além de possuir extraordinária capacidade para adquirir resistência a antimicrobianos, especialmente aos antibióticos β -lactâmicos, mediada pelo gene *mecA* que codifica a PBP2a, uma proteína com baixa afinidade a metilina, e outros antibióticos da classe[1,2].

Entre as espécies do gênero, os *Staphylococcus aureus* destacam-se pela frequência em que estão envolvidos em processos infecciosos [3] enquanto que os *Staphylococcus* Coagulase Negativo (SCN) foram por longo tempo considerado saprofítico ou raramente patogênico. Contudo, algumas espécies de SCN têm sido responsáveis por infecções variadas em pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos [4,5]. Muito da patogenicidade de SCN está ligada a sua habilidade para aderir a biomateriais, enquanto que a patogenicidade de *S. aureus* é considerada multifatorial e relacionada a uma série de enzimas e toxinas que promovem danos ao tecido, permitem a disseminação e favorecem a evasão do sistema imune do hospedeiro [6]. Entre essas toxinas destacam-se as hemolisinas (à exemplo da γ -toxina), leucocidinas (à exemplo da Leucocidina de Panton-Valentine - PVL), e a Toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1).

As hemolisinas e leucocidinas são exotoxinas que causam lise de eritrócitos e leucócitos, resultando em uma intensa resposta inflamatória e leucopenia, como mostrado por modelos animais [7]. A hemolisina γ -toxina é codificada pelo locus gênico *hlgACB* constituído pelos genes estruturais *hlgA*, *hlgC* e *hlgB* que codificam as proteínas HlgA, HlgC (classe S) e HlgB (classe F). A leucocidina de Panton-Valentine é

codificada pelo *locus* gênico *lukSF*, constituído pelos genes *lukS* e *lukF* que codificam duas proteínas, LukS-PV (classe S) e LukF-PV (classe F). Essas proteínas são bicomponentes produzindo pares, entre si, de proteínas funcionais com atividade citotóxica: HlgA+HlgB, HlgC+HlgB, LukS-PV+LukF-PV [7, 8, 9].

A TSST-1 é um superantígeno, codificada pelo gene *tst*, que ativa linfócitos T, desencadeando uma resposta imune mais intensa, resultando na liberação massiva de citocinas, que desencadeiam uma exacerbada resposta inflamatória, dano tecidual, extravasamento do conteúdo capilar e hipotensão [9, 10].

Visando contribuir para o conhecimento da frequência no ambiente hospitalar dos fatores de virulência apresentados, tendo em vista sua agressividade e a dificuldade no tratamento quando associados com cepas meticilina resistentes, o presente trabalho investigou a prevalência dos genes *hlg*, *luk*, *tst* e *mecA* em amostras de *S. aureus* e SCN obtidos de um hospital universitário.

2. Material e métodos

2.1 Bactérias e extração de DNA

Os estudos envolveram 96 isolados de *Staphylococcus* spp (46 cepas de *S. aureus* e 50 SCN) obtidos de sangue (75), cateter (12), ferida operatória (04), pulmão (03), secreção traqueal (01) e vegetação de átrio (01). As amostras foram obtidas de demanda espontânea no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil, no período de 2002 a 2010, caracterizadas como infecção hospitalar, seguindo os critérios do CDC [11] e identificadas por testes bacteriológicos convencionais. O DNA das amostras foi extraído segundo descrito [12] e quantificado utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.2 Pesquisa de genes de virulência e resistência à meticilina por PCR

As amplificações foram realizadas em reações individuais preparadas em volume final de 25 µl, contendo, 5 µl de tampão Green Go Taq (Promega, Brasil), dNTP 200µM, MgCl₂ 25mM, 1 U de Go Taq DNA polymerase (Promega, Brasil), 20 ng de DNA de cada amostra e 10µM dos *primers* específicos (Tabela 1) As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler ep gradiente (Eppendorf) nas seguintes condições: 30 ciclos de 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, extensão final 72°C 7 min. Cinco microlitros do produto final foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os géis foram corados com SYBR safe DNA gel stain (10 µl/100 ml), visualizados em transiluminador UV e digitalizados usando o software KODAK 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, U.S.A.).

2.3 Sequenciamento

Os produtos das amplificações dos genes toxigênicos das amostras de SCN foram purificados utilizando ExoSAP-IT[®] (Anfimetrix) e sequenciados pelo método de Sanger, na Plataforma Tecnológica da FIOCRUZ, na subunidade CPqAM/FIOCRUZ-PE. As sequências obtidas foram submetidas à análise no GenBank utilizando o BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) e o programa Clustal X para alinhar as sequências de nucleotídeos.

3. Resultados

Foi investigada por PCR a presença dos genes *hlgCB* que codifica para a γ -toxina, *lukSF*, a PVL e *tst* que codifica para a TSST-1 e a do gene *mecA* que codifica a PBPa em 96 isolados (46 *S. aureus* e 50 SCN) nosocomiais obtidos de demanda

espontânea no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil, no período de 2002 a 2010. A tabela 2 mostra a distribuição dos genes *hlgCB*, *lukSF*, *tst* e *mecA* amplificados por PCR por ano de isolamento nas amostras de *S. aureus* e SCN.

O amplicon de 310 pb referente ao gene *mecA* foi amplificado nos 96 isolados analisados. O segmento de 937 pb esperado para os genes *hlgCB* (figura 1) foi amplificado em 68,7% (66/96) dos isolados analisados: 93,4% (43/46) dos *S. aureus* e 46% (23/50) dos SCN. O segmento de 433pb esperado para o *cluster lukSF* (figura1) foi amplificado em 20,8% (20/96) dos isolados: 28,2% (13/46) dos *S. aureus* e 14% (07/50) dos SCN. O fragmento de 445 pb esperado para o gene *tst* (figura 1) foi amplificado em 4,1% (04/96): 6,5% (03/46) dos *S. aureus* e 2% (01/50) dos SCN. Nas análises utilizando o BLAST foi encontrado 99% de identidade entre os amplicons sequenciados (*hlgCB*, *lukSF*, *tst* e *mecA*), inclusive aqueles amplificados nas amostras de SCN, e as sequências depositadas no GeneBank (acesso: BA000033 e BA000018).

4. Discussão

Dentro do gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* é a espécie melhor estudada quanto ao potencial toxigênico pela gravidade e frequência das infecções que causa [15]. O SNC vem despontando como responsável por graves infecções, resultante principalmente do aumento de procedimentos invasivos [16], entretanto os estudos do seu potencial toxigênico ainda são escassos.

No presente trabalho foi evidenciada a presença do gene *mecA*, o principal determinante da resistência a meticilina em *Staphylococcus*, em todas as amostras analisadas.

O tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e *Staphylococcus* Coagulase Negativo meticilina resistente (MRSCN) além

serem difíceis devido a redução nas opções terapêuticas, exigem maior atenção, desde que a administração inadvertida de antibióticos β -lactâmicos podem acarretar aumento da expressão de exotoxinas como a α -toxina, PVL, e TSST-1 [17], além de induzirem uma resposta S.O.S em *S. aureus*, gerando uma alta frequência de transferência horizontal de ilhas de patogenicidade codificando fatores de virulência, tais como TSST-1 [18].

O estudo revelou uma alta prevalência dos genes *hlgCB* em *S. aureus* (95%), como já observado por outros autores [7, 19]. Curiosamente, foi observado grande número de SCN originados de hemoculturas albergando o gene citotoxigênico *hlg*. Segundo Voug & Otto [20] dentre as hemolisinas identificadas no gênero *Staphylococcus*, SCN produz apenas a δ -toxina. Surpreendentemente, neste estudo, 46% (23/50) dos isolados de hemocultura amplificaram os genes da γ -toxina. Em vista das propriedades leucotóxicas e eritrocíticas da γ -toxina [21], a presença do gene *hlg* em SCN, significa uma importante aquisição para a espécie, destacando seu papel como patógeno emergente no ambiente hospitalar.

A presença do *cluster lukSF* que codifica a PVL tem sido mundialmente considerada um marcador molecular de isolados CA-MRSA, clinicamente relacionados com infecções simples de pele que evoluem rapidamente para pneumonia necrosante por via hematogênica e infecções severas de pele [22,23].

As infecções por MRSA podem ser categorizadas em adquiridas em hospitais (HA-MRSA) ou adquiridas na comunidade (CA-MRSA) [24]. Cepas HA-MRSA estão geneticamente relacionadas com a presença do *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) tipos I, II e III, enquanto que cepas CA-MRSA estão associadas a *SCCmec* tipo IV e V [25].

Neste trabalho, os isolados PVL positivos, apresentavam o SCCmec tipo II, III e IV, sendo genotipicamente distintos (dados não mostrados). A presença da PVL em isolados SCCmec tipo II e III, associados a cepas HA-MRSA, permite admitir um possível contato entre cepas nosocomiais e comunitárias e a transferência horizontal do profago Φ Sa2 [26] que carrega os genes *luk*.

Um importante achado neste estudo foi a presença do *cluster lukSF* em isolados de SCN nosocomiais, confirmado a partir do sequenciamento do fragmento amplificado. Até o presente, essa é a primeira vez que o gene *lukSF* é descrito em SCN proveniente de hemocultura, associado a infecção hospitalar. A presença destes genes havia sido descrita apenas em SCN isolados de vacas e ovelhas [27], não sendo do nosso conhecimento sua presença em isolados obtidos de humanos.

Interessante salientar que 20% (19/95) dos *Staphylococcus* spp possuíam o *cluster* gênico *lukSF* e os genes *hlgCB*. A associação da PVL com a γ -toxina confere ao isolado propriedades leucotóxicas contra polimorfonucleares e macrófagos, além da capacidade de lisar eritrócitos humanos [8], podendo tornar o quadro infeccioso mais agudo e agressivo.

Merece salientar que isolados obtidos de ponta de cateter foram PVL positivo. Por fazer parte de microbiota normal da pele e levando em consideração a capacidade, de algumas cepas, de produzirem biofilme. A infecção dos pacientes pode ocorrer a partir do local de inserção do cateter endovenoso ou outro tipo de biomaterial, facilitando o processo de invasão chegando a comprometer sítios estéreis como o sangue. Este achado justifica o alto potencial invasivo dessas amostras de SCN no ambiente hospitalar.

O gene *tst* foi detectado em três amostras de *S. aureus*. A função primária da TSST-1 seria debilitar o sistema imune do hospedeiro o suficiente para permitir a

propagação do patógeno e o progresso da doença. Embora amostras HA-MRSA possam está relacionadas com a produção deste superantígeno, como descritos por alguns estudos na França e Japão [28], nossos dados revelam que houve uma baixa prevalência deste gene circulante no ambiente hospitalar.

A produção de TSST-1 por SCN é questionada [29] e alguns autores insinuam que se trata provavelmente de *S. aureus* que não expressam a enzima coagulase devido a mutações no gene [30,31]. No presente trabalho a presença do gene *tst* foi detectada por PCR em uma amostra de SCN e o amplicon sequenciado, obtendo 99% de similaridade com outras sequencias do gene *tst* depositadas, obtidas de *S. aureus*. A identificação da amostra como SNC foi confirmada por testes bacteriológicos convencionais e a ausência do gene da coagulase foi confirmada por PCR (dados não mostrados).

Em conclusão, os resultados do trabalho apontam para um alto potencial toxigênico e de resistência das cepas de *Staphylococcus* estudadas. Chama a atenção para as cepas de SCN tendo em vista que carreavam genes de toxinas importantes, comuns em *S. aureus*, o que enfatiza a necessidade de uma maior atenção no isolamento desta espécie muitas vezes considerada mero contaminante. A presença em SCN de genes homólogos em *S. aureus* faz sugerir a transferência horizontal de fagos e ilhas de patogenicidade entre as espécies, codificando fatores de virulência, que pode contribuir para a predominância de cepas mais adaptadas (mais virulentas), durante um surto.

5. Referência

- [1] F. Vandenesch, T. Naimi, M.C. Enright, G. Lina, G.R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, Marie-Elisabeth Reverdy, J. Etienne, Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying

Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence, *Emerg Infect Dis* 9 (2003) 978-984.

- [2] Piao C., Karasawa T., Totsuka K., Uchiyama T., Kikuchi K., Prospective surveillance of community-onset and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a university-affiliated hospital in Japan, *Microbiol Immunol* 49 (2005) 959-970.
- [3] A. Martins, M.L.R.S. Cunha, Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects, *Microbiol Immunol* 51 (2007) 787-795.
- [4] C. von Eiff, G. Peters, C. Hellmann, Pathogenesis of infection due to coagulase-negative staphylococci, *Lancet Infect Dis* 2 (2002) 677-685.
- [5] E. Garza-González, R. Morfin-Otero, J. M. Llaca-Díaz, E. Rodriguez-Noriega, Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting, *Epidemiol Infect* 138 (2010) 645-654.
- [6] Arvidson S, Tegmark K, Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, *Int J Med Microbiol* 291 (2001) 159-170.
- [7] G. Lina, Yves Piémont, Florence Godail-Gamot, Michèle Bes, Marie-Odile Peter, Valérie Gauduchon, François Vandenesch, Jerome Etienne, Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29 (1999) 1128-1132.
- [8] M.M. Dinges, P.M. Orwin, P.M. Schlievert, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clin Microbiol Rev* 13 (2000) 16-34.

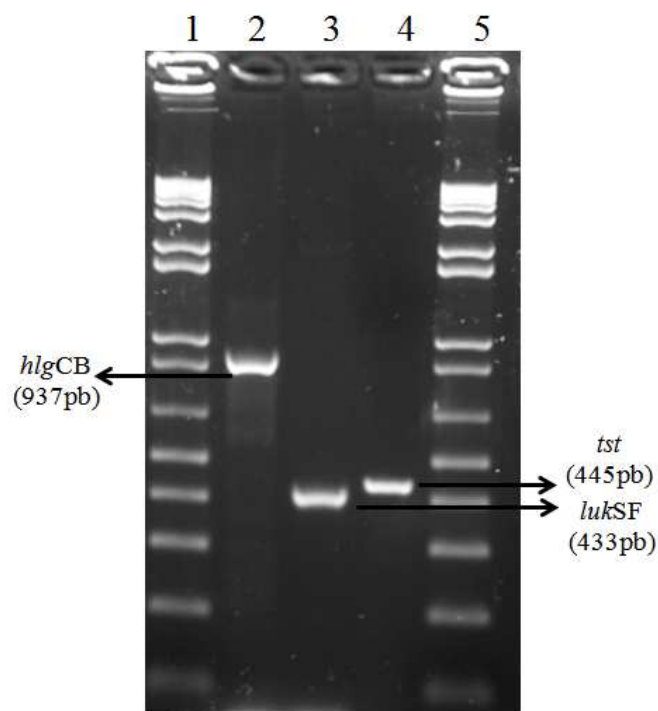
- [9] S. Cunha, O. Calsolari, Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects, Microbiol Insights 1 (2008) 13-24.
- [10] K. Plata, A.E. Rosato, G. Wegrzyn, *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity, Acta Biochimica Polonica 56 (2009) 597-612
- [11] CDC - Guideline for isolation precautions in hospitals. Evolution of practices, Am J Infect Control 1 (1996) 24-31.
- [12] M.F.L. Freitas, I.S. Luz, V.M. Silveira-Filho, J.W.P. Júnior, T.L.M. Stamford, R.A. Mota, M.J. Sena, A.M.P. Almeida, V.Q. Balbino, T.C. Leal-Balbino, Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis, Pesqui Vet Bras 28 (2008) 617-621.
- [13] K. Becker, R. Roth, G. Peters, 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, J Clin Microbiol 36 (1998) 2548-2553.
- [14] E. Perez-Roth, F. Claverie-Martin, F. Villar, S. Méndez-Álvarez, Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance, J Clin Microbiol 39 (2001) 4037-4041.
- [15] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus* infections, N Engl J Med 339 (1998) 520-532.
- [16] W.E. Kloos, T.L. Bannerman, Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci, Clin Microbiol Rev 7 (1994) 117-140.
- [17] D.L. Stevens, Y. Ma, D.B. Salmi, E. McIndoo, R. J. Wallace, A. E. Bryant, Impact of antibiotics on expression of virulence associated exotoxin genes in methicillin

sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, J Infect Dis 195 (2007) 202-211.

- [18] S.J. Dancer, The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J Antimicrob Chemother, 61 (2008) 246-253.
- [19] I. Mesrati, M. Saïdani, S. Ennigrou, B. Zouari, S. Ben Redjeb, Clinical isolates of Pantone-Valentine leucocidin- and gamma-haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections, J Hosp Infect 74 (2010) 265-268.
- [20] C. Voun, M. Otto, *Staphylococcus epidermidis* infections, Microbes Infect 4 (2002) 481-489.
- [21] G. Prévost, B. Cribier, P. Couppié, P. Petiau, G. Supersac, V. Finck-Barbançon, H. Monteil, Y. Piemont, Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities, Infect Immun 63 (1995) 4121-4129.
- [22] S.F. Graves, S.D. Kobayashi, F.R. Deleo, Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. J Mol Med 88 (2010) 109-114.
- [23] T.J. Foster, Immune evasion by staphylococci, Nat Rev Microbiol 3 (2005) 948-958.
- [24] Timothy S. Naimi, Kathleen H. LeDell, Kathryn Como-Sabetti, Stephanie M. Borchardt, David J. Boxrud, Jerome Etienne, Susan K. Johnson, Francois Vandenesch, Scott Fridkin, Carol O'Boyle, Richard N. Danila, Ruth Lynfield, Comparison of community and health care associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection, JAMA 290 (2003) 2976-2984.

- [25] R.H. Deurenberg, E.E. Stobring, The evolution of *Staphylococcus aureus*, *Infect Genet Evol*, doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007.
- [26] J. Kaneko, Y. Kamio, Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanisms, and organization of genes, *Biosci Biotechnol Biochem* 5 (2004) 981-1003.
- [27] N. Ünal, O. D. Çınar, Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis, *Trop Anim Health Prod* 44 (2012) 369-375.
- [28] A. Tristan, T. Ferry, G. Durand, O. Dauwalder, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, J. Etienne, Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Hosp Infect* 62 (2007) 105-109.
- [29] R.P. Novick, P. Schlievert, A. Ruzin, Pathogenicity and resistance islands of staphylococci, *Microbes and Infect* 3 (2001) 585-594.
- [30] R. Victor, F. Lachica, Karl F. Weiss, R. H. Deibel, Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*, *Appl Microbiol* 18 (1969) 126-127.
- [31] Fox L.K., Besser T.E., Jackson S.M., Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle, *J Vet Med Assoc* 209(1996) 1143-1146.

Fig 1. Gel de agarose 1,5%, mostrando os produtos amplificados por PCR dos genes de virulência. 1 e 5: 1KB plus DNA ladder; 2: amplificação referente ao *cluster hlgCB* com 937pb; 3: amplificação referente ao *cluster lukSF* com 433pb; 4: amplificação referente ao gene *TST* com 445pb.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 1. Primers utilizados: genes alvo, sequência, referências.

Alvos	Sequência nucleotídeos (5'-3')	Referência
<i>hlgCB</i>	GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCAACGGAT	[7]
<i>lukSF</i>	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	[7]
<i>tst</i>	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG ATCGAACTTTGGCCCATACTTT	[13]

Tabela 2. Distribuição das amostras nosocomiais de *S. aureus* e SCN por fonte de isolamento e genes amplificados por PCR

Amostras	Fonte	Genes amplificados			
		Nº	<i>hlg</i>	<i>luk</i>	<i>tst</i>
<i>S. aureus</i>					
	Sangue	30	27	10	02
	Ponta de cateter	07	07	03	00
	Secreção pulmonar	01	01	00	00
	Líquido pleural	02	02	00	00
	Vegetação de átrio	01	01	00	00
	Ferida operatória	03	03	00	01
	Secreção traqueal	01	01	00	00
Total		45	42	13	03
SCN					
	Sangue	44	22	06	01
	Ponta de cateter	04	01	00	00
	Ferida operatória	01	01	00	00
Total		49	24	06	01

ARTIGO 2

Título corrente – Biofilme e genes *icaAD* em *Staphylococcus* spp

Produção de biofilme e presença dos genes *icaAD* em isolados de *Staphylococcus* spp associados a infecção hospitalar.

Wagner Luis Mendes de Oliveira*, Ewerton Lucena Ferreira*, Eduarda Vanessa Cavalcante Manguiera*, Marinalda Anselmo Vilela**, Nilma Cintra Leal*, Alzira Almeida*/+

*Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, **Departamento de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/UPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Neste trabalho 46 isolados de *Staphylococcus* spp (28 *S. aureus* e 18 SCN) associados à infecção hospitalar, foram analisados quanto à formação de biofilme no meio Agar Vermelho Congo (AVC) e em placa de cultura de tecido (PCT) e, presença dos genes *icaAD* por PCR e a transcrição por RT-PCR. O *cluster icaAD* foi amplificado em 45 dos 46 isolados e destes apenas 17 produziram biofilme em AVC e PCT, demonstrando a que detecção destes genes não permite associar sua presença com a expressão em testes fenotípicos. A transcrição dos genes *icaA* e *icaD* ocorreu em apenas um isolado dos 18 analisados por RT-PCR. Este isolado foi biofilme positivo no teste em AVC, mas negativo em PCT sugerindo que a produção de biofilme é dependente de outros genes relacionados com a adesão; seis isolados amplificaram apenas o *icaD* e em

11 não houve transcrição, sugerindo a presença de outros mecanismos envolvidos na formação do biofilme e independente dos genes investigados.

Palavras chaves: *Staphylococcus*, biofilme, operon *ica*

INTRODUÇÃO

Os estafilococos estão habitualmente presentes na microflora da pele e mucosas humanas e podem se comportar como patógenos oportunistas causadores de infecções associadas à implantação de dispositivos prostéticos (Ferreti et al. 2002, Lindsay & von Holy 2006). Em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus Coagulase Negativo* (SCN) a capacidade de aderir e colonizar materiais inertes como implantes médicos (cateter venoso, válvulas cardíacas e próteses articulares) está associada à formação de um biofilme que confere às células bacterianas proteção contra as defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (Davey & O'Toole, 2000).

A formação do biofilme em *Staphylococcus* spp, inicia pela adesão da bactéria a superfícies abióticas e posteriormente ocorre acumulação celular decorrente da adesão intercelular (von Eiff et al. 2002) e depende da produção de uma adesina conhecida como PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) ou PNAG (Polymeric N-acetyl-glucosamine) codificada pelo operon *icaADBC* (O'Gara, 2007), sendo os genes *icaA* e o *icaD* os mais importantes nesse processo.

A capacidade de formar biofilme pelos estafilococos é comumente avaliada por testes fenotípicos utilizando o meio Agar Vermelho Congo ou o teste de adesão em microplacas de cultura de tecidos (Christensen et al. 1985, Freeman et al. 1989), entretanto os resultados desses testes podem ser influenciados por vários fatores como componentes dos meios de cultura e condições ambientais (O'Neill et al. 2007).

Neste estudo isolados de estafilococos associados à infecção hospitalar foram analisados quanto a habilidade para formar biofilme pelos métodos fenotípicos no meio Agar Vermelho Congo (AVC) e em placa de cultura de tecido (PCT); e quanto a presença e expressão dos genes *icaA* e *icaD*. Visando otimização do meio AVC foram introduzidas modificações na sua formulação (substituição de componentes como meios básicos e fonte de açúcar) e no inóculo (suplementação com glicose e NaCl).

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias - Os estudos envolveram 46 isolados de *Staphylococcus* spp (28 *S. aureus* e 18 SCN), obtidos de sangue (23), cateter (13), ferida operatória (05), pulmão (03), secreção traqueal (01) e vegetação de átrio (01). As amostras foram obtidas de demanda espontânea no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil, no período de 2002 a 2004, caracterizadas como infecção hospitalar, seguindo os critérios do CDC (1996) e identificadas por testes bacteriológicos convencionais.

Detecção da produção de biofilme

Produção de biofilme em Agar Vermelho Congo (AVC) - Foram realizadas três modificações no meio AVC descrito por Freeman et al. (1989) e que tem como formulação: BHI (37 g/L), sacarose (50 g/L), ágar (10 g/L) e o corante vermelho Congo (0.8 g/L). (1) substituição da sacarose pela glicose no meio AVC (original); (2) substituição do BHI por Ágar Mueller-Hinton (MHA) (HIMEDIA); (3) substituição do BHI por Ágar Base Sangue (BAB) (HIMEDIA).

As placas foram inoculadas por semeio esgotante das culturas crescidas em BHI líquido (HIMEDIA) por 18h a 37°C usando alças calibradas (0,01 uL). Os resultados foram observados após incubação a 37°C por 24 a 48 h seguindo os critérios de

interpretação descritos em Arciola et al. (2002): (a) crescimento de colônias pretas/enegrecidas de consistência áspera e/ou seca e cristalina, considerado biofilme positivo, (b) crescimento de colônias vermelhas/róseas de consistência lisa com pontos enegrecidos no centro, considerado biofilme negativo.

Produção de biofilme em placa de cultura de tecido (PCT) - Realizado seguindo um protocolo baseado em Mathur et al. (2006): uma alça de cada cultura crescida por 18h a 37°C em placas de ágar BHI (HIMEDIA) acrescido de 10% de sangue de carneiro foi suspensa em 5 mL de BHI líquido (HIMEDIA) e 200 µL dessa suspensão na densidade óptica de 0,08 – 1 foram dispensados em placas de cultura de tecido de fundo chato com 96 poços. Após incubação por 18h a 37°C, sem agitação o sobrenadante de cada poço foi descartado, os poços lavados com 200 µL de PBS pH 7,5, e o sedimento fixado com 20 µL de acetato de sódio 2% seguido pela coloração com cristal violeta (0.1% w/v) durante 1 minuto. Os poços foram novamente lavados com H₂O deionizada e as placas secas em temperatura ambiente. A densidade óptica das bactérias aderentes coradas foi mensurada usando um leitor de ELISA (BIO-RAD 3550) na densidade óptica (D.O.) de 570nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata, a formação do biofilme foi calculada pela média das densidades ópticas seguindo os parâmetros descritos por Mathur et al. (2006): D.O. <0.120 considerado não aderente e não formador de biofilme; D.O. 0.120-0.240 considerado aderência moderada e moderada formação de biofilme e D.O. >0.240 considerado aderência forte e forte formação de biofilme. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Avaliação da composição do inóculo - Considerando que a produção de biofilme nos testes em AVC e PCT poderia ser influenciada pela composição do inóculo (Fitzpatrick

et al. 2006), foram realizados ensaios para comparar os inóculos preparados em BHI líquido, BHI líquido suplementado com 2% de glicose (BHI_{glu}) e BHI líquido suplementado com 4% de NaCl (BHI_{sal}).

Deteção do cluster icaAD - O DNA das amostras foi extraído segundo Freitas et al. (2008) e quantificado utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para amplificação do segmento entre os genes *icaAD* foram utilizados os *primers*: *icaAF*: 5'CCT AAC TAA CGA AAG GTAG3'; *icaDR*: 5'GGC AAT ATG ATC AAG ATA C3' (Vasudevan et al. 2003). As reações foram preparadas em volume final de 25 µl, contendo, 5 µl de tampão Green Go Taq (Promega, Brasil), dNTP 200µM, MgCl₂ 25mM, 1 U de Go Taq DNA polymerase (Promega, Brasil), 20 ng de DNA e 10µM dos *primers*. As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler ep gradiente (Eppendorf) programado para 30 ciclos compostos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min. Cinco microlitros do produto final foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Os géis foram corados com SYBR safe DNA gel stain (10 µl/100 ml), visualizados em transiluminador UV e digitalizados usando o software KODAK 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, U.S.A.).

Os produtos das amplificações de quatro isolados representativos foram purificados utilizando ExoSAP-IT[®] (Anfimetrix) e sequenciados pelo método de Sanger, na Plataforma Tecnológica da FIOCRUZ, na subunidade CPqAM/FIOCRUZ-PE. As sequências obtidas foram submetidas à análise no GenBank utilizando o BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

Extração do RNA total e análise transcricional (RT-PCR) – Para extração do RNA 1 mL da cultura crescida a 37°C por 24 horas em BHI foi centrifugado e o sedimento ressuspenso em 500 µL de TE 10:1; em seguida foi adicionado lisozima (20 mg/mL),

lisostafina (20 mg/mL) e Proteinase K (mg/mL) para a lise das células. O RNA foi purificado e concentrado utilizando o kit RNA Clean & Concentrator™-5 (ZYMO RESEARCH). A transcrição reversa foi realizada utilizando os mesmos *primers* da PCR e uma mistura de reação em volume final de 20µL composta de 100 ng de RNA, 20 pmol de cada primer e 10 mM dNTP; os tubos foram incubados a 65°C por 5 min e resfriados no gelo por 1 min; em seguida foram adicionados 4µL do tampão de transcrição (5X) que acompanha a enzima contendo: 1 µL dTT 0,1M, 1 µL RNase out e 1 µL Superscript III (Invitrogen, Brasil); seguido de homogeneização e incubação a 50°C por 60 min, inativação por aquecimento a 75°C por 15 min; os produtos foram estocados a -80°C. Como controles negativos, foram realizadas reações com a Superscript III, e substituindo a Superscript III por H₂O DEPC. Para amplificação do cDNA transcrito foram utilizados os seguintes *primers* para o gene *icaA* (*icaAF*: 5'CCT AAC TAA CGA AAG GTA G 3'; *icaAR*: 5'AAG ATA TAG CGA TAA GTG C 3') e para o gene *icaD* (*icaDF*: 5'AAA CGT AAG AGA GGT GG 3'; *icaDR*: 5'GGC AAT ATG ATC AAG ATA C 3') (Vasudevan et al. 2003) em reações individuais nas condições descritas acima.

Ética – Os isolados foram obtidos de demanda espontânea sem necessidade da utilização de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e com autorização da chefia do Departamento de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESULTADOS

Produção de biofilme em AVC - No ensaio utilizando o meio AVC original 32 dos 46 isolados (21 *S. aureus* e 11 SCN) produziram colônias enegrecidas características de biofilme positivo perceptíveis após 48 h de incubação (Fig. 1; Tabela 1 e 2).

A substituição da sacarose pela glicose no meio AVC não favoreceu a produção de biofilme, e as colônias desenvolvidas apresentaram coloração vermelha e aspecto seco/rugoso.

A substituição do BHI pelo MHA e BAB não modificou quantitativamente os resultados, o número de cepas produtoras de biofilme foi igual com os três meios. A utilização do MHA também não modificou o tempo de crescimento das colônias em relação ao meio original, mas a utilização do BAB reduziu o tempo de crescimento e em 24h de incubação foram visíveis colônias biofilme positivo características.

Produção de biofilme em PCT– Nos ensaios de avaliação da produção de biofilme pelo teste em PCT em 46 isolados, oito revelaram aderência forte e forte formação de biofilme; nove tiveram aderência moderada e moderada formação de biofilme e 29 foram não aderentes e não formadores de biofilme (Fig. 2; Tabela 1 e 2).

Avaliação da composição do inóculo - A suplementação do BHI com a glicose não favoreceu a formação de biofilme nos ensaios em AVC e PCT em relação ao BHI original. A suplementação com o NaCl estimulou a produção do biofilme no meio AVC: cinco amostras de *S. aureus* e quatro de SCN não produtores de biofilme em AVC, a partir de inóculos utilizando BHI_{sal} passaram a produzir biofilme.

Nove amostras (quatro *S. aureus* e cinco SCN) obtidas de ponta de cateter foram biofilme positivo no meio AVC. Entretanto, só três dessas, todas SCN, mostraram

aderência no meio PCT. As amostras obtidas de secreção traqueal, vegetação de átrio, secreção pulmonar e uma amostra de líquido pleural foram biofilme positivo no meio em AVC e revelaram aderência forte e forte formação de biofilme em PCT (Tabelas 1 e 2).

Detecção dos genes icaAD e análise transcricional por RT-PCR - O segmento de 1.696 pares de base (pb) esperado para o *cluster icaAD* foi amplificado por PCR em 45 dos 46 isolados (28 *S. aureus* e 17 SCN) revelando a presença dos genes (Fig. 3).

A transcrição dos genes *icaA* e *icaD* foi avaliada por RT-PCR em 18 isolados representativos, selecionados pela discordância entre os resultados obtidos nos testes de AVC e PCT (Tabela 1 e 2). Apenas um isolado de *S. aureus* amplificou os fragmentos esperados para os genes *icaA* (1.315 pb) e *icaD* (381 pb). Entre os demais, seis isolados (cinco *S. aureus* e um SCN) amplificaram apenas o gene *icaD* e em 11 não houve amplificação para ambos os genes. Os produtos das amplificações foram sequenciados e apresentaram 99% de identidade com sequências depositadas no GenBank.

DISCUSSÃO

A detecção da produção do biofilme em PCT é considerada o teste padrão pela sensibilidade, precisão e reprodutibilidade além da vantagem de ser um teste quantitativo da aderência das bactérias (Nasr et AL. 2012). O teste no meio AVC fornece informações qualitativas sobre as características das colônias desenvolvidas e a formação do biofilme e é considerado uma alternativa fácil e rápida para detecção da formação de biofilme na rotina laboratorial (Jain & Agarwal 2009). No entanto este teste pode falhar no estudo de fatores de adesão porque só permite avaliar a expressão de PIA/PNAG e não permite, como o teste em PCT, avaliar a aderência, primeira fase

da formação do biofilme. Segundo Iorio et al (2011) a combinação dos dois testes para avaliação da formação de biofilme permite melhor determinação do potencial na produção do biofilme em isolados clínicos.

No nosso trabalho procuramos avaliar o papel de outra fonte de açúcar na composição do meio AVC, no entanto, a substituição da sacarose pela glicose no meio AVC não favoreceu a produção de biofilme. Os isolados produtores de biofilme apresentaram coloração vermelha e aspecto seco/rugoso, enquanto no meio AVC utilizando sacarose, as colônias apresentaram coloração mais escura.

Croes et al (2009) relataram que no meio AVC sem sacarose as colônias produtoras de biofilme apresentam coloração de vermelho a vinho e a adição de sacarose no meio resulta na formação de colônias mais escuras. Segundo Delcour et al. (1999) e Mack et al. (2007) o desdobramento da sacarose em frutose é essencial na formação de N-Acetil-glicosamina e consequente produção de PIA/PNAG. A interação do corante vermelho Congo diretamente com polissacarídeos formando complexos e sua interação com metabolitos secundários é um fator importante na formação de colônias escuras (Nars et al 2012) evidenciando que a formação de biofilme no teste em AVC é dependente da presença de uma fonte de açúcar.

A utilização de inóculo suplementado com glicose (BHI_{glu}), não favoreceu a formação de biofilme nos ensaios em AVC e PCT. Segundo O'Neill et al (2007) a glicose induz a formação de biofilme, independente do operon *ica*. Em contrapartida, a utilização de inóculo com NaCl (BHI_{sal}) favoreceu a produção de biofilme no teste em AVC. Segundo Fitzpatrick et al (2005) e O'Neill et al (2007) a indução da formação de biofilme pelo NaCl ocorre porque o sal é um ativador transcricional do operon *icaADBC* e as cepas produtoras de biofilme induzido por NaCl são *ica*-dependente.

Dos 13 isolados obtidos de ponta de cateter, seis foram negativos no teste em PCT, mas positivos em AVC. Além de *icaADBC*, outros genes estão envolvidos na formação do biofilme em biomateriais, como os que codificam as proteínas Aap (proteína associada a acumulação), AtlE (proteína de adesão estafilocócica) e Bap (proteína associada ao biofilme) (Von Eiff et al 2002). Estas proteínas também participam na estimulação e formação da adesina intercelular, PIA/PNAG. A ausência destes outros fatores na formação do biofilme não é detectada pelo teste em AVC, mas pode ser pelo teste em PCT, desde que a fraca adesão ao poliestireno da placa sugere falha na expressão destes outros genes. Deve-se ainda considerar que fatores ambientais podem influir na expressão de biofilme, e que o comportamento dos isolados *in vitro* pode ser diferente *in vivo* (Barth et al. 1989).

Embora os genes *icaAD* tenham sido encontrados em 99% dos isolados analisados nesse trabalho, 14 isolados *icaAD* positivos se revelaram biofilme negativo nos testes em PCT e AVC, demonstrando que a presença do gene *ica* não está associada a sua expressão em alguns isolados. Segundo Cafiso et al (2004) a presença dos genes *ica* permite considerar os isolados como potenciais produtores de biofilme, mesmo que nos testes fenotípicos sejam biofilme negativos.

A falta de produção de biofilme em alguns isolados tem sido atribuída a inserção de um segmento de 1.332 pb, IS256, que interpola-se entre os genes *icaA* e *icaD*, inativando a expressão de N-acteil-glicosaminiltransferase pelo gene *icaA* (O’Gara, 2007). No nosso estudo buscamos a amplificação por PCR do segmento *icaAD* completo visando detectar a presença da IS256, desde que a amplificação de um segmento maior que o esperado indicaria a presença desse elemento transponível. Entretanto, todas as amostras *icaAD* positivo amplificaram o fragmento de 1.696 pb esperado, e a identidade desse fragmento foi confirmada pelo sequenciamento.

A atividade transcricional dos genes *icaA* e *icaD* foi avaliada por RT-PCR em 18; foi observado que destas, seis expressavam o gene *icaD*, mas não *icaA*, e entre elas quatro foram biofilme negativo nos testes em AVC e PCT. A transcrição do gene *icaD* não é determinante para a produção de biofilme, mas a transcrição do gene *icaA* é indispensável para a produção de PIA/PNAG (Cafiso et al 2004). Entretanto, dois isolados que expressavam apenas o gene *icaD* foram biofilme positivo no teste em AVC, confirmando a hipótese da existência de um mecanismo independente do operon *ica* na produção de biofilme (Rode et al 2007). Por outro lado, um isolado biofilme negativo em PCT amplificou ambos os genes *icaA* e *icaD*, sugerindo o envolvimento de fatores de adesão na formação do biofilme. Em 11 isolados a expressão dos genes *icaA* e *icaD* não foi detectada por RT-PCR, e destes cinco foram biofilme positivo no meio AVC. Este resultado reforça a possibilidade da existência de outro mecanismo de produção de biofilme independente de *ica*. Tal mecanismo não seria influenciado pela presença da glicose, como os mecanismos independentes de *ica* conhecidos, desde que os testes com glicose, neste estudo, não mostraram influência na produção de biofilme.

Os resultados evidenciaram que a presença dos genes *icaAD* não assegura que os isolados sejam biofilme positivo nos testes fenotípicos em AVC e PCT. Possivelmente outros mecanismos envolvidos na formação do biofilme independente do gene *ica* existem e a expressão dos genes *icaAD* é dependente de condições ambientais e pode estar condicionada a presença de outros genes relacionados a adesão. O teste em AVC além de mais fácil e rápido que o teste em PCT é mais sensível e pode ser otimizado pela substituição de componentes como meios básicos e fonte de açúcar na sua formulação e no uso de um inóculo suplementado com glicose e NaCl.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de pós-graduação; à Plataforma Tecnológica de Sequenciamento do CPqAM/FIOCRUZ/PE.

REFERÊNCIAS

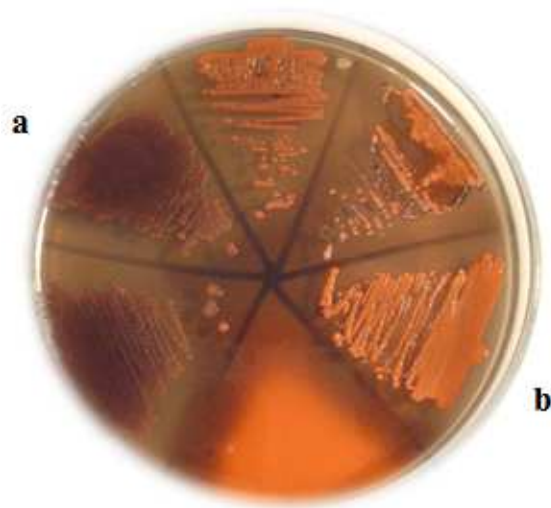
- Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L 2002 Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 23:4233–4239.
- Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG 1989 In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials* 10:325-328.
- Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S 2004 Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* 10(12):1081–1088.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) 1996 Guideline for isolation precautions in hospitals. Evolution of practices. *Am J Infect Control* 1(24):24-31.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH 1985 Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6):996–1006.
- Croes S, Deurenberg RH, Boumans Marie-Louise L, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE 2009 *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol* 9:229.

- Davey ME, O'Toole GA 2000 Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847-867.
- Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P 1999 The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:159-184.
- Ferretti G, Mandalà M, Dicosimo S, Moro C, Curigliano G, Barni S 2002 Catheter-related bloodstream infections, Part1: pathogenesis, diagnosis, and management. *Cancer Control* 9:513-523.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP 2005 Evidence for *ica*ADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal Clinical Microbiology* 43(4):1973–1976.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP 2006 Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Hosp Infect* 62:120–122.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT 1989 New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Path* 42(8):872–874.
- Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, Júnior JWP, Stamford TLM, Mota RA, Sena MJ, Almeida AMP, Balbino VQ, Leal-Balbino TC 2008 Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28:617-621.
- Iorio NL, Lopes AP, Schuenck RP, Barcellos AG, Olendzki AN, Lopes GL, dos Santos KR 2011 A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiol immunol* 55(1):28-33.

- Jain A, Argawal A 2009 Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Meth* 76:88-92.
- Lindsay D, & von Holy A 2006 Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 64:313-325.
- Mack D, Davies AP, Harris LG, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JKM 2007 Microbiol interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem* 387:399-408.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A 2006 Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Ind J of Med Microbiol* 24(1):25–29.
- Nasr RA, AbuShady HM, Hussein HS 2012 Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of *Staphylococci*. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 13:269-274.
- O’Gara JP 2007 *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270(2): 179–188.
- O’Neil E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O’Gara JP 2007 Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 45:1379-1388.
- Rode TM, Langsrud S, Holck A, Moretro T 2007 Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol* 16:372-383.
- von Eiff C, Peters G, Heilmann C 2002 Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lan Infec Dis* 2:677-685.

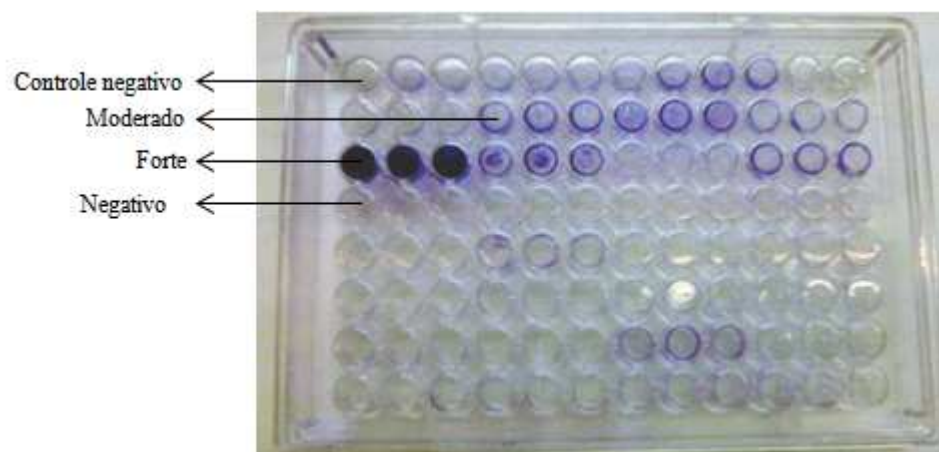
Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS 2003 Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 92:179-185.

Figura 1. Aspecto das colônias de *Staphylococcus* spp em meio AVC; a: Colônias positivas para a produção de biofilme, com coloração enegrecida e aspecto seco; b: Colônias negativas para a produção de biofilme, com coloração avermelhada e aspecto mucóide.



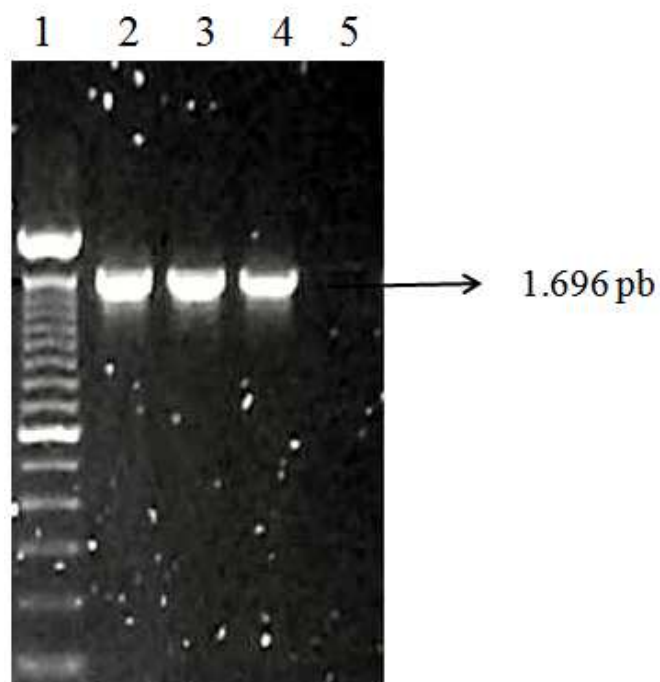
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2. Teste em placa de cultura de tecido com 96 poços com células aderidas coradas com cristal violeta. Em detalhe os três níveis de produção de biofilme: forte, moderado e negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 - Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados por PCR do *cluster icaAD*.. Linha 1, marcador de 100pb; linhas 2 a 4, amplificação de 1.696pb referente ao *cluster icaAD*; linha 5, controle negativo da reação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela I

Produção de biofilme em placas de cultura de tecido e Agar Vermelho Congo; presença e expressão de *icaAD* em *Staphylococcus aureus*

Amostra	Ano	Fonte	Produção de biofilme		Presença e expressão de <i>icaAD</i>		
			AVC	PCT	PCR	RT-PCR	
					<i>icaAD</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
03802	2002	Hemocultura	+	-	+	nr	nr
047	2002	Ponta de cateter	+	-	+	+	+
121	2002	Hemocultura	+	+	+	nr	nr
126	2002	Ponta de cateter	+	-	+	-	+
202	2002	Hemocultura	+	-	+	nr	nr
227	2002	Hemocultura	+	+	+	-	-
236	2002	Hemocultura	-	-	+	-	+
666	2003	Secreção pulmonar	+	+	+	nr	nr
687	2003	Hemocultura	+	-	+	nr	nr
722	2003	Ponta de cateter	+	-	+	nr	nr
741	2003	Hemocultura	+	+	+	nr	nr
749	2003	Hemocultura	+	+	+	nr	nr
794	2003	Ponta de cateter	-	-	+	-	+
807	2003	Líquido pleural	+	+	+	nr	nr
808	2003	Líquido pleural	+	-	+	nr	nr
835	2003	Hemocultura	+	+	+	nr	nr
853	2003	Ponta de cateter	-	-	+	-	-
859	2003	Vegetação de átrio	+	+	+	nr	nr
03804	2004	Ponta de cateter	+	-	+	nr	nr
464	2004	Hemocultura	-	-	+	-	+
599	2004	Ferida operatória	-	-	+	nr	nr
613	2004	Ferida operatória	+	-	+	nr	nr
780	2004	Hemocultura	+	+	+	nr	nr
827	2004	Hemocultura	-	-	+	nr	nr
862	2004	Ferida operatória	+	+	+	nr	nr
969	2004	Ponta de cateter	-	-	+	-	+
990	2004	Hemocultura	+	-	+	nr	nr
995	2004	Secreção traqueal	+	+	+	nr	nr

PCT: placa de cultura de tecido; AVC: Agar Vermelho Congo (Freeman et al 1984); nr: não realizado; -: negativo; +: positivo

Tabela II

Produção de biofilme em placas de cultura de tecido e Agar Vermelho Congo; presença e expressão de *icaAD* em SCN

Amostra	Ano	Fonte	Produção de biofilme		Presença e expressão de <i>icaAD</i>		
			AVC	PCT	PCR	RT-PCR	
					<i>icaAD</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
081	2002	Hemocultura	-	-	+	-	-
105	2002	Hemocultura	+	-	+	-	-
109	2002	Hemocultura	+	-	+	nr	nr
124	2002	Ponta de cateter	+	+	+	nr	nr
162	2002	Hemocultura	+	+	+	-	-
237	2002	Ferida operatória	+	+	+	nr	nr
804	2003	Ferida operatória	+	-	+	-	-
009	2004	Hemocultura	+	+	+	-	+
012	2004	Hemocultura	-	-	+	nr	nr
013	2004	Hemocultura	-	-	+	nr	nr
070	2004	Ponta de cateter	-	-	+	nr	nr
412	2004	Hemocultura	-	-	+	nr	nr
522	2004	Ponta de cateter	+	-	+	nr	nr
525	2004	Ponta de cateter	+	-	-	-	-
937	2004	Ponta de cateter	+	+	+	nr	nr
942	2004	Ponta de cateter	+	+	+	nr	nr
976	2004	Hemocultura	-	-	+	nr	nr
992	2004	Hemocultura	-	-	+	-	-

PCT: placa de cultura de tecido; AVC: Agar Vermelho Congo (Freeman et al 1984); nr: não realizado; -: negativo; +: positivo

Tabela III

Produção de biofilme em placas de cultura de tecido e Agar vermelho Congo em *Staphylococcus aureus* e SCN

Espécies	TESTE			
	PCT		AVC	
	+	-	+	-
<i>S. aureus</i>	11	17	21	07
SCN	06	12	11	07

PCT: placa de cultura de tecido; AVC: Agar Vermelho Congo (Freeman et al 1984);
-: negativo; +: positivo

ARTIGO 3

Diversity of SCCmec elements in samples of nosocomial *Staphylococcus* spp in Recife, Pernambuco, Brazil.

W. L. M. Oliveira¹, E. V. C. Manguiera¹, M. A. Vilela², J. Gee³, J. W. Marsh³, O. P. Neto¹, L. H. Harrison³, A. Almeida¹, N. C. Leal¹

¹Department of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhães / FIOCRUZ - Campus UFPE, Recife, PE; ² Department of Bacteriology, University Hospital Oswaldo Cruz / UPE, Recife, PE, Brazil; ³Public Health Infectious Diseases Laboratory, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

Resumo

The studies to determine the type of SCCmec, susceptibility to oxacillin and expression of PBP2a in 39 *Staphylococcus aureus* and 45 Coagulase Negative *Staphylococcus* obtained from cases of hospital infection in Recife, Pernambuco, Brazil, were observed that 61% of the samples showed resistance to oxacillin tests of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and growth on Mueller Hinton Agar plates. Among susceptible isolates, 76% expressed the PBP2a detected by Western blot using polyclonal anti-PBP2a. Sixty-eight isolates were classified in the following types of SCCmec: SCCmec type II (17%), SCCmec type III (26%), SCCmec type IV (34.5%) and SCCmec type V (3.5%). In 16 isolates (19%) of the SCCmec type was not determined and were named as SCCmec Not Defined (ND). These results demonstrate the diversity of SCCmec elements and the occurrence of clonal lineages associated epidemiologically with the

community in hospitals making difficult the separation between clonal lineages of community acquired and hospital environment and reinforce that isolated SCN can act as reservoirs of SCC*mec* elements contributing to emergency new methicillin resistant clones.

Keywords: *Staphylococcus* spp, oxacillin, PBP2a, SCC*mec*, *mec* complex, *ccr* complex

Introduction

Methicillin resistance in staphylococci is conferred by penicillin-binding protein alternatively known as PBP2a or PBP2', essential for cell wall synthesis and bacterial growth in the presence of β -lactam antibiotics. The *mecA* gene, located on mobile genetic element SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*), encodes the PBP2a. Currently eleven SCC*mec* types (I-XI) are described and divided based on the structure of the Cassette Chromosome Recombinase (*ccr* complex) and the complex *mec* [1, 2]. The determinations of the types of SCC*mec* are defined by the information obtained from the structure of *mec* and *ccr* complex. Most infections acquired in hospitals is associated with colonization by *Staphylococcus aureus* methicillin resistant (MRSA), but there has been an increase in cases of methicillin resistant *Staphylococcus* Coagulase negative (MRSCN) in nosocomial infections, particularly infections associated with implantation of prosthetic devices [3, 4].

Considering the importance of understanding the distribution of SCC*mec* types and profiles of susceptibility to oxacillin in the hospital environment, the aim of this study was to determine the type of SCC*mec*, evaluate susceptibility to oxacillin and the expression of PBP2a in *Staphylococcus* spp associated with nosocomial infection.

Materials and Methods

Bacteria and DNA extraction

The studies involved 84 samples of *Staphylococcus* spp (39 *S. aureus* and 45 SCN), obtained from spontaneous demand of the Oswaldo Cruz University Hospital, Recife, Brazil, from 2002 to 2010, characterized as nosocomial infection, following the criteria of CDC [5] and identified by conventional bacteriological tests. Were used as control reference strains and MRSA05166 MRSA05279 (SCC*mec* type II), and MRSA04673 MRSA05616 (SCC*mec* type III), and MRSA01171 MRSA03343 (SCC*mec* type IV) and MRSA02928 and MRSA03231 (SCC*mec* type V) obtained by courtesy of the Public Health Infectious Diseases Laboratory, University of Pittsburgh, USA. The DNA samples were extracted as described [6] and quantified using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Testing of susceptibility to oxacillin

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for oxacillin was performed using microdilution broth Mueller Hinton (MH), in parallel with the growth test on Mueller Hinton agar plates (MHA) containing 4% NaCl and 6 mg/ml oxacillin, incubated at 37°C for 24 hours and following the criteria of interpretation of CLSI [7].

Determination of SCC*mec* type

The determination of SCC*mec* was performed by multiplex PCR by Kondo et al. [8] using the primers described in Table 1. The reactions were prepared in a final volume of 50 µL containing 5 µL 1 Green Go Taq buffer (Promega, Brazil), 2.5 mM of each deoxynucleotide, 25 mM MgCl₂, 1.5 U of Go Taq DNA polymerase (Promega, Brazil), 20 ng DNA from each sample 10 µM and the primers (table 1). Amplifications

were performed in thermocycler Mastercycler ep gradient (Eppendorf) under the following conditions: 30 cycles of 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, 72°C final extension 7 minutes. Five microliters of the final products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gels stained with GelRed Nucleic Acid Stain, visualized on a UV transilluminator and digitalized using the KODAK 1D software version 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA).

Sequencing

The region of *mec* complex corresponding to each type of SCC*mec* found in this study was sequenced by Long-range PCR using the primers described in Table 1. The reactions were performed in a final volume of 50 µL containing 5 µL of 10 × buffer PfuUltra™ II (Stratagene), 200 mM dNTP, 10 mM primers, 1 µL PfuUltra™ II fusion HS DNA polymerase (Stratagene) and 10 ng of DNA. The reactions were performed in Mastercycler ep gradient thermal cycler (Eppendorf) under the conditions recommended by the manufacturer. The amplicons were purified using ExoSAP-IT® (Anfimetrix) and sequenced by the Sanger method, in the Technology Platform FIOCRUZ (CPqAM / FIOCRUZ, BRA) and Genomics platform and Core Proteomics Laboratory (University of Pittsburgh, USA). The sequences obtained were processed using the SeqMan II of Lasergene software (DNASTAR, Inc., Madison, WI) and compared with GenBank sequences using BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

Identification of PBP2a

Western Blot technique was used to investigate the expression of PBP2a in all samples oxacillin sensitive by MIC tests, using polyclonal anti-PBP2a as described by Mangueira [11].

Results

Susceptibility to oxacillin

Among the 39 *S. aureus* and 45 SCN analyzed by MIC testing and growth on Mueller Hinton agar supplemented with oxacillin, 25 *S. aureus* were susceptible and 14 were resistant, while 08 SCN were sensitive and 37 were resistant based on criteria established by CLSI (2012). The MIC results are presented in Figure 1.

Detection of PBP2a in the samples were sensitive to oxacillin

Detection of PBP2a was investigated in 25 samples of *S. aureus* and eight SCN, all the samples are sensitive to oxacillin in MIC and MHA supplemented with oxacillin tests, by Western blot using antiserum anti-PBP2a. The expression of PBP2a was recognized in 22 (67%) isolates of *S. aureus* and three (9%) isolates of SCN (Fig. 2).

Determination of SCCmec type

According amplifications obtained from *mec* and *ccr* complex (Fig. 3 and 4), the 68 isolates were classified as SCCmec types II (17%), SCCmec type III (26%), SCCmec type IV (34.5%) and SCCmec type V (3.5%) as shown in Table 2.

Sixteen isolates (19%) due to lack of amplification in the PCR reactions directed to the *mec* complex were named as SCCmec undefined, although the *ccr* complex has been characterized as type 2.

Among the 22 SCCmec type III isolates were found beyond *ccrAB3*, a second *ccr* element, termed *ccrC* pointing to the presence of SCCmercury associated with this cassette.

The amplicons of the *mec* complex obtained from each SCC*mec* element were sequenced and the sequences assembled using the ClustalW alignment. Each *mec* complex region sequenced was compared using the BLAST software and found 99% identity with the sequences deposited in GenBank: accession number D86934 for SCC*mec* type II, AB037671 for SCC*mec* type III, AB063172 for SCC*mec* type IV and to AB121219 SCC*mec* type V.

Discussion

To determine the susceptibility of *Staphylococcus* spp methicillin, the disk diffusion test with oxacillin is the most widely used, but the determination of the presence of the *mecA* gene and / or expression of PBP2a are considered more sensitive tests [7, 12, 13]. This because some isolates may harbor the *mecA* and not be detected by phenotypic testing, presenting sensitive to oxacillin [14].

In the present work it was observed that 49% of the SCN carrying the *mecA* gene showed high level resistance to oxacillin (≥ 128 mg / L), frequency greater than those presented by *S. aureus* (7%). This is because clinical isolates of SCN are generally more resistant to antimicrobials than *S. aureus*, confirming the role of SCN as a reservoir of resistance genes [16]. There were no discrepancies between the tests of MIC and MHA supplemented with oxacillin.

In our study 67% of the isolates of *S. aureus* and 9% of SCN susceptible to oxacillin, expressed PBP2a, a result particularly relevant when we consider the low oxacillin MIC shown by some samples of *S. aureus*. Strains of *S. aureus* sensitive to oxacillin, positive for the *mecA* gene and expressing PBP2a were found [17] and named OS-MRSA (oxacillin-sensitive - methicillin resistant *S. aureus*), considered a new type of MRSA strain. Since many clinical laboratories only evaluate susceptibility to

oxacillin, without observing the presence of *mecA* or PBP2a expression of such isolates may be mistaken for susceptible isolates leading to inappropriate antimicrobial therapy and consequent induction of resistance [14, 17]. This order to implement the research *mecA* and/or expression of PBP2a in laboratories is important for a correct medical therapy.

In the present study, we observed a frequency of SCC*mec* types III and IV, similar to that registered in hospitals in southern and southeastern Brazil [19, 20]. The SCC*mec* types II and V, little reported in Brazilian hospitals, were found in a smaller percentage.

The SCC*mec* type II strains are associated with acquired in a hospital environment and were first observed in strains of *S. aureus* at hospitals from Japan, whose strains N315 is known as one of the most studied [26]. This element was found in 17% of samples, frequency higher than reported in other studies in Brazilian hospitals [27, 28].

The SCC*mec* type III, is characteristic of the Brazilian epidemic clone described in 1992 [Sader, 1994], which has the ability to spread in the hospital environment and character Pandemic having been found in other countries in South America, Europe and Asia [4, 21, 22]. Some SCC*mec* type III are coupled to other SCC elements (Staphylococcal Cassette Chromosome), as SCC*mercury* which confers resistance to heavy metals as mercury and cadmium [1, 23]. The SCC*mercury* features a cassette chromosome recombinase independent of that present in SCC*mec* type III and known as *ccrC*. In our study all isolates amplified the SCC*mec* type III allotype *ccrC* pointing to the presence of this second elements associated SCC.

The SCC*mec* type IV is epidemiologically associated with strains of *S. aureus* methicillin-resistant community-acquired (CA-MRSA) and strains present in USA-300

and USA-400 responsible for outbreaks in some European countries and U.S. cities. However a change in the Epidemiological profile in relation to the clonal lineages harboring SCC*mec* type IV has been observed worldwide, where there is an increase in hospital-acquired strains (HA-MRSA) harboring this element [24] up to 95% of isolates [25] . This high prevalence of type IV SCC*mec* can be attributed to genetic advantages of this element, such as reduced size cassette allowing rapid dispersal in the hospital environment [24], besides being colonizing health professionals [20]. In this study 35% of the isolates, including *S. aureus* and SCN showed the SCC*mec* type IV.

The SCC*mec* type V well as the SCC*mec* type IV is epidemiologically associated with community strains. This element was first described in 2009 in Brazilian hospitals associated with nasopharyngeal colonization in children [30]. In the present study we found in three samples obtained from blood and catheter tip in isolated SCN.

Two isolates harboring the SCC*mec* type II and two SCC*mec* type III showed sensitivity to oxacillin and were not expressing PBP2a. This sensitivity in strains possessing SCC*mec* types II and III is usually caused by the repression imposed by *mecI* gene on *mecA* gene [27] since these elements have all the genes that form the *mec* complex. On the other hand, we find isolates harboring SCC*mec* type IV and V also sensitive to oxacillin and not expressing PBP2a. Unlike SCC*mec* types II and III, the SCC*mec* type IV and V cassettes usually produce PBP2a, due to the absence of regulatory elements such the *mecI* gene, which is replaced by IS1272 and IS431, both detected by PCR and subsequently confirmed by sequencing of amplicons in our isolates.

Sixteen isolates not been characterized as the type of SCC*mec*, although they had been determined the type of *ccr* complex, type 2. However, we were unable to

determine the class of the *mec* complex. Some authors have found some difficulty in determining the type of SCC*mec* in some samples [8, 32]. The difficulty in determining the SCC*mec* element may be due to the presence of new structures and rearrangements or recombination in areas within the *mec* and *ccr* complexes [8, 32, 33]. Further studies are needed to determine the SCC*mec* type of these isolates.

In conclusion, our studies detected the presence of isolates with low MIC to oxacillin, carrying the *mecA* gene and expressing PBP2a. This profile was dispersed in isolates harboring a variety of SCC*mec* elements (types II to V) within the hospital environment. We found a prevalence of clonal lineages associated epidemiologically with the community, such as SCC*mec* types IV and V, within the studied environment difficult the separation between clonal lineages of the community and those acquired in the hospital. Our data also confirmed that isolated SCN can act as reservoirs of SCC*mec* elements contributing to the emergence of new methicillin-resistant clones.

Acknowledgments

The Foundation of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for funding the project and the scholarship graduate, the Exchange Training Program International Center for Research in Global Infectious Diseases, NIH; Technology Platform for the sequencing CPqAM / FIOCRUZ / PE.

Reference

- [1] Deurenberg RH, Stobrer EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; **8**: 747-763.

- [2] Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 2011; **60**: 95-103.
- [3] O’Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; **50**: 582-587.
- [4] Martins A, Cunha MLRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol* 2007; **51**: 787-795.
- [5] CDC - Guideline for isolation precautions in hospitals. Evolution of practices. *Am J Infect Control* 1996; **1**: 24-31.
- [6] Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, Júnior JWP, Stamford TLM, Mota RA, Sena MJ, Almeida AMP, Balbino VQ, Leal-Balbino TC. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. *Pesqui Vet Bras* 2008; **28**: 617-621.
- [7] CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22th informational supplement, M100-S22. CLSI, Wayne, Pa.
- [8] Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 264-274.
- [9] Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar F, Méndez-Álvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4037-4041.

- [10] Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 297-304.
- [11] Mangueira EVC. Avaliação da resistência à antiobióticos β -Lactâmicos em isolados de *Staphylococcus* spp (Dissertação de mestrado) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ, 2012.
- [12] Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *J Bras Patol Med Lab* 2007; **43**: 399–406.
- [13] Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol* 2009; **27**: 27–29.
- [14] Petinaki E, Kontos F, Maniatis N. Emergence of two oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clones in a Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 1090-1091.
- [15] Akcam FZ, Tinaz GB, Kaya O, Tigli A, Ture E, Hosoglu S. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities. *Microbiol Res* 2009; **164**: 400-403.
- [16] SzCzuka E, Kaznowski A, Bosacka K, Strzemieeczna E. Antimicrobial resistance and presence of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus* sp. *Folia Microbiol (Praha)* 2009; **54**: 153-156.
- [17] Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, Nakae T, Sunakawa K. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007; **13**: 79-86.

- [18] Ender M, McCallum N, Berger-Bächi B. Impact of *mecA* promoter mutations on *mecA* expression and β -lactam resistance levels. *Int J Med Microbiol* 2008; **298**: 607-617.
- [19] Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, Del Peloso PF, da Costa Ferreira Leite C, Texeira LA, Figueiredo AM. Detection and characterization of international CA-MRSA clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community and hospital associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**: 339-345.
- [20] Sousa-Junior, F C, Silvia-Carvalho MC, Fernandes MJ, Vieira MF, Pellegrino FL, Figueiredo AM, de Melo MC, Milan EP. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2009; **42**: 870-992.
- [21] Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, de Lencastre H, et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2400-2404.
- [22] dos Santos Soares MJ, da Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J Hosp Infect* 2000; **44**: 301-308.
- [23] Ito, T, Katayama, Y, Asada, K, Mori, N, Tsutsumimoto, K, Tiensasitorn, C, Hiramatsu, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 323-1336.
- [24] de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, Vidal CFL, Figueiredo AMS. Emergence in Brazil of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 1165-1172.

[25] Trindade PA, Pacheco RL, Costa, SF, Rossi, F, Barone, AA, Mamizuka EM, Levin AS. Prevalence of SCCmec Type IV in Nosocomial Bloodstream Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 3435-3437.

[26] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 486–493.

[27] Mombach Pinheiro Machado AB, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 1328–1333.

[28] Carmo M, Inoue F, Andrade S. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2011; **44**: 1013-1017.

[29] Lewis RA, Dyke KGH. MecI repress synthesis from the β -lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicro Chemother*, 2000, **45**: 139-144.

[30] Lamaro-Cardoso J, de Lencastre H, Kipnis A, Pimenta FC, Oliveira LSC, Oliveira RM, Nouer SS, Aires-de-Sousa M, Milheiriço C, Andrade AL. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3991–3997.

[31] Teruyo I, Xiao XM, Fumihiko T, Keiko O, Harumi Y, Keiichi H. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase *ccrC*. *Antimicrob Agent Chemother* 2004; **48**: 2637-2651.

[32] Zhiyong Z, Chunhong P, Xiaoju L. Diversity of SCC*mec* elements in methicillin resistant coagulase negative Staphylococci clinical isolates. *Plos one* 2011; **6**(5): e20191.

[33] Garza-González E, López D, Pezina C, Muruet W, Bocanegra-García V, Muñoz I, Ramírez C, LLaca-Díaz JM. Diversity of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* structures in coagulase negative staphylococci and relationship to drug resistance. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 323-329.

Table 1. Primers used in this study: sequences, target genes and references.

	Primers	Sequences (5'-3')	Target gene	Reference
Multiplex PCR				
<i>ccr</i> Complex	MA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>	[8]
	MA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA	<i>mecA</i>	[8]
	α 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	[8]
	α 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	[8]
	α 3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	[8]
	β C	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrB1, ccrB2, ccrB3</i>	[8]
	γ R	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	<i>ccrC</i>	[8]
	γ F	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	<i>ccrC</i>	[8]
<i>mec</i> Complex	MI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecI</i>	[8]
	IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	IS1272	[8]
	IS2	TGAGGTTATTTCAGATATTTCGATGT	IS431	[8]
	MA7	ATATACCAAACCCGACAACTACA	<i>mecA</i>	[8]
Long-range PCR				
	mec_F1	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	<i>mecA</i>	[9]
	mec_R1	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	<i>mecA</i>	[9]
	mec_F2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	<i>mecA</i>	[10]
	mec_R2	GGTCCCATTAACTCTGAAG	<i>mecA</i>	[10]
	SA10	GACTTGATTGTTTCCTCTGTT	<i>mecI</i>	[10]
	SA09	AATGGCGAAAAAGCACAACA	<i>mecI</i>	[10]
	SA17	CGCTCAGAAATTTGTTGTGC	<i>mecR1</i>	[10]
	SA18	ATCCTCCTTATATAAGACTAC	<i>mecR1</i>	[10]
	SA19	CATATCGTGAGCAATGAACTG	<i>mecR1</i>	[10]
	SA13	GTCTCCACGTTAATTCCAATT	<i>mecR1</i>	[10]
	SA14	GTCGTTTCATTAAGATATGACG	<i>mecR1</i>	[10]
	SA15	CAAGCACCGTTACTATCTGC	<i>mecR1</i>	[10]
	SA20	ATAAGTAAAACAATGATGGCAAT	<i>mecR1</i>	This study
	SA21	TGTTTATCCCATTGTTGTTTCAG	<i>mecR1</i>	This study
	SA22	TGATTAAGGCATTCCGACAAA	<i>mecR1</i>	This study
	IS8	ATCGAACGCCACTCATAACA	IS1272	This study

Table 2. Distribution of SCCmec types among *S. aureus* and SCN analyzed.

SCCmec types	(%)	<i>S. aureus</i>	SCN	Target amplified	
		N° (%)	N° (%)	<i>mec</i> complex	<i>ccr</i> complex
SCCmec II	17	10 (12)	04 (05)	Class A	<i>ccrAB2</i>
SCCmec III	25	09 (10)	13 (15)	Class A	<i>ccrAB3</i>
SCCmec IV	35	10 (12)	19 (23)	Class B	<i>ccrAB2</i>
SCCmec V	04	00 (00)	03(04)	Class C	<i>ccrC</i>
Undefined	19	10 (12)	06 (07)	-	<i>ccrAB2</i>
Total	100	39 (46)	45 (54)		

Fig 1. MIC of oxacillin for *S. aureus* and SCN, according to the parameters of the CLSI (2012).

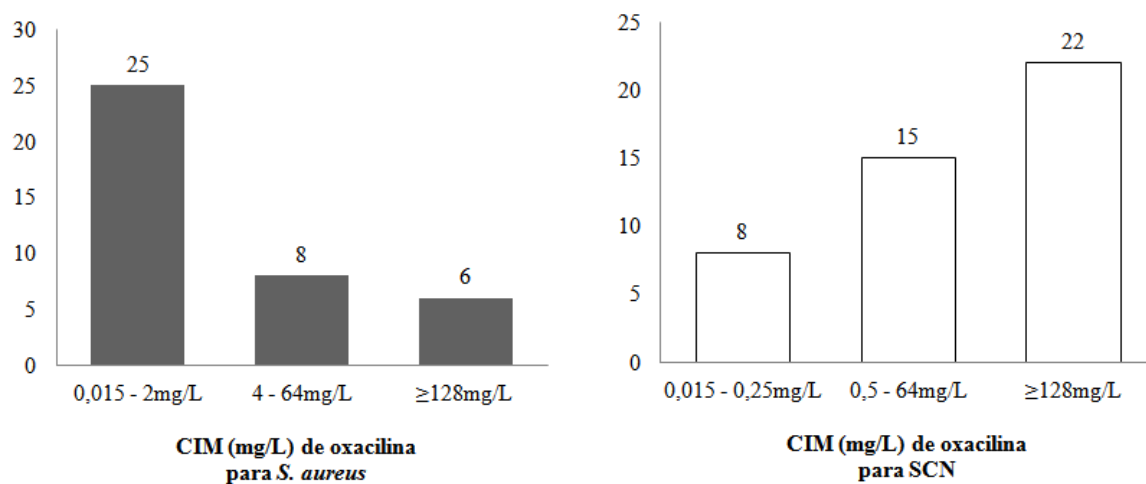


Fig 2. Presence and absence of PBP2a among isolates of *S. aureus* and SCN sensitive to oxacillin.

