

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Juliana Lamaro Cardoso

Epidemiologia molecular e riscos associados ao portador nasal de *Staphylococcus aureus* isolados de crianças de creches de Goiânia

Orientadora: Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia S. S. Andrade

Co-Orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Orientadora estrangeira: Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Herminia de Lencastre

Tese de doutorado

Goiânia-GO  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Juliana Lamaro Cardoso

Epidemiologia molecular e riscos associados ao portador nasal de *Staphylococcus aureus* isolados de crianças de creches de Goiânia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia S. S. Andrade

Co-Orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Orientadora estrangeira: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Herminia de Lencastre

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Tropical, área de concentração: Epidemiologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Goiânia-GO  
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

Lamaro-Cardoso, Juliana.

Epidemiologia molecular e riscos associados ao portador nasal de *Staphylococcus aureus* isolados de crianças de creches de Goiânia [manuscrito] : / Juliana Lamaro-Cardoso. - 2009.

103 f. : figs, tabs.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia S. S. Andrade.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,  
Medicina Tropical, 2009.  
Bibliografia.

1. *S. aureus* e MRSA 2. Crianças. I. Título

*“O cientista não estuda a natureza por ela ser útil;  
estuda-a porque ela lhe apraz, e ela lhe apraz por ser bela.  
Se a natureza não fosse bela, não mereceria ser conhecida,  
e se não merecesse ser conhecida, não valeria a pena viver”.*

Henri Poincaré

*Real success is finding your lifework in the work that you love.*

David McCullough

*Aos meus amados pais Diva Helena e Jorge Luiz Cardoso por estarem sempre presentes na minha vida, exemplos de força, coragem e dedicação. Vocês são a luz que me orienta, o porto seguro em que me refugio, a paz que me sustém. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais e por todas as oportunidades que me proporcionaram.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, “ter a coragem de dar os passo que desejamos é a única maneira de demonstrar que confiamos em Ti, que sempre está em todos os lugares, em todos os instantes, amando a cada um de nós. Pela força deste amor chegamos até aqui”.

À Professora Dra. Ana Lúcia S. Sgambatti Andrade, minha orientadora, pela confiança depositada em meu trabalho, pela possibilidade de consolidar meus conhecimentos sob sua supervisão, vencer desafios e ousar. Por todas as valiosas oportunidades de crescimento profissional e pessoal que me fizeram buscar a superação de minhas deficiências e o deslumbramento de novos horizontes. Sua capacidade de liderança, competência e dinamismo são exemplos a serem seguidos. Muito obrigada pela parceria sincera e especialmente por estar me proporcionando tamanha realização profissional.

Ao professor Dr. André Kipnis, meu co-orientador, pelo exemplo de ética, caráter e dedicação. Sua extrema competência e direcionamento na realização dos testes de isolamento e identificação das amostras, bem como sua disponibilidade e colaboração com os questionamentos sobre os métodos de tipagem molecular foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio constante em todos os momentos.

À professora Dra. Hermínia de Lencastre, minha orientadora estrangeira, pela credibilidade no projeto colaborativo com a o Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior, proporcionando-me oportunidade impar de crescimento pessoal e profissional, ao ingressar na equipe do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, em Oeiras, Portugal. Profissionalismo, ética, disciplina e produtividade nortearão meus passos como pesquisadora.

À professora Dra. Marta Aires de Sousa, minha co-orientadora estrangeira, pela convivência amigável, disponibilidade em orientar e supervisionar meu aprendizado nos métodos de tipagem molecular, compartilhando ensinamentos importantes para a minha capacitação profissional.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular, ITQB, Oeiras, Portugal, pelo carinho com que me receberam, pela convivência agradável, pela presteza e colaboração em todas as etapas do estágio, bem como o auxílio dispensado na realização dos testes laboratoriais. Foi um grande aprendizado trabalhar com um grupo tão produtivo. Conquistei amigos para a vida inteira.

À professora Dra. Maria Cláudia D.P.B. André, pela amizade verdadeira, pelo carinho e apoio constante em todos os momentos que partilhamos e pela generosidade em compartilhar ensinamentos.

Ao professor Renato Maurício de Oliveira, pela disponibilidade em ajudar, pela competência na coordenação do trabalho realizado em campo, assim como toda a equipe que realizou a coleta das amostras.

À Caritas M. Franco, pela convivência, dedicação ao projeto, capacidade de trabalho e direcionamento na realização da coleta das amostras e questionários.

À Leda Maria de A. Valadão pela amizade, pelos ensinamentos compartilhados com paciência e bom-humor e pela colaboração nos experimentos deste estudo.

Às amigas, Cristyane G. B. B. Rocha, Lara Stefânia N. O. Leão, Ana Beatriz Mori, Luciana S. C. Oliveira, Liana J. Borges e ao amigo Yves M. F. Ternes pela amizade sincera, pela companhia diária, apoio constante, cumplicidade, incentivo e carinho. Pela participação e auxílio na realização deste estudo, meus agradecimentos. É uma alegria estarmos juntos, compartilhando momentos, conhecimentos e dificuldades que nos fazem crescer.

À coordenação e Corpo docente do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) e da Universidade Federal de Goiás, meu respeito e admiração, uma vez que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento profissional.

Aos funcionários e servidores técnico-administrativos do IPTSP pela atenção e colaboração prestada.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de participar do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDPEE) e apoio financeiro nesta etapa.

Aos meus queridos irmãos, Alexandre e Leonardo, pelo amor que nos une, pelo carinho, companheirismo e compreensão em todos os momentos.

À minha família, em especial minha avó Alcy Lamaro, pela certeza do amor incondicional que nos une, pela presença constante e incentivo ao meu crescimento e aprimoramento.

Aos meus amigos queridos pela amizade sincera, apoio e compreensão em todos os momentos.

Às crianças e seus responsáveis que consentiram em particular do estudo, minha sincera gratidão.

A todos que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho, meu reconhecimento e eterna gratidão.



## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Agente etiológico.....	1
1.2. Determinantes da colonização do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.3. Mecanismos de resistência a oxacilina.....	6
1.3.1. MRSA associados aos serviços de saúde (HA-MRSA).....	11
1.3.2 MRSA associados à comunidade (CA-MRSA).....	12
1.4. Clones internacionais de MRSA.....	21
2. Justificativa.....	28
3. Objetivos.....	30
4. Material e Métodos.....	31
4.1. Área e população de estudo.....	31
4.2. Coleta de dados.....	31
4.3. Amostragem e tamanho da amostra.....	32
4.4. Coleta de <i>swab</i> nasal e procedimentos microbiológicos.....	32
4.5. PCR para detecção do gene <i>mecA</i> .....	33
4.6. PCR para detecção do gene <i>femB</i> .....	34
4.7. Teste de suscetibilidade - Disco Difusão.....	34

4.8. PCR multíplex para tipagem do SCC <i>mec</i> .....	35
4.9. PCR para detecção do complexo gene <i>ccr</i> .....	37
4.10. Análise do polimorfismo do DNA cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	38
4.11. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	42
4.12. <i>spa</i> typing.....	44
4.13. PCR para detecção do gene <i>lukS-F</i> , codificador da Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL).....	45
4.14. Análise de dados.....	46
5. Conclusões.....	47
6. Referências Bibliográficas.....	48
Anexos.....	83
1º Artigo.....	84
2º Artigo.....	91
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	100
Questionário.....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da composição estrutural dos SCC <i>mec</i> tipos I a VI identificados em MRSA. Adaptado de Deurenberg & Stobberingh, 2008.....	10
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos de portador nasal de <i>S. aureus</i> em crianças que freqüentam creches em diferentes localidades geográficas.....	05
Tabela 2: Detecção do SCCmec tipo V por continente.....	17
Tabela 3: Estudos de epidemiologia molecular de MRSA realizados no Brasil.....	27
Tabela 4: Seqüência dos primers utilizados no PCR multiplex para determinação dos tipos de SCCmec.....	36
Tabela 5: Clones internacionais de MRSA utilizados para comparação por PFGE com os MRSA isolados das crianças de creche do município de Goiânia.....	41
Tabela 6: Sequências dos primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CA-MRSA	Community-associated methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
CC	Complexo Clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEB	Clone Epidêmico Brasileiro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMEI	Centro Municipal de Educação Infantil
DCC	Day-care Center
EMRSA	Clones epidêmicos de MRSA
EUA	Estados Unidos da América
HA-MRSA	Healthcare-associated methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95%
LMP	Low Melting Point Agarose
MDR	Multidrug-resistant
MLST	Multilocus Sequence Typing
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NCTC	National Collection of Type Cultures
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PVL	Panton-Valentine Leukocidin

OMA	Otite Média Aguda
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
OSPC	Oceania South Pacific Clone
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
ST	Sequence Type
STX	Trimethoprim-Sulfamethoxazole
SWP-MRSA	South West Pacific MRSA clone
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UPFMA	Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com sensibilidade intermediária à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
WA-MRSA	Western-Australia MRSA clone

## RESUMO

**Objetivos:** (i) avaliar a prevalência de portador nasal de *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em crianças que frequentam centros municipais de educação infantil (CMEIs) no município de Goiânia; (ii) determinar os potenciais fatores de risco relacionados com a colonização nasal pelo *S. aureus* e por MRSA; (iii) caracterizar os isolados de MRSA circulantes nos CMEIS utilizando métodos de tipagem molecular. **Material e Métodos:** De agosto e dezembro de 2005, *swabs* nasais foram coletados de crianças menores de cinco anos de idade atendidas em 62 CMEIs do município. Informações clínicas e sócio-demográficas associadas à aquisição de *S. aureus* e MRSA foram obtidas por meio de questionários aplicados aos pais ou responsáveis. Os *swabs* foram processados seguindo metodologia padronizada para identificação e isolamento de *S. aureus*. A confirmação da espécie foi realizada pela amplificação do gene *femB* por reação em cadeia da polimerase (PCR). A presença do gene *mecA* foi detectada por PCR e os isolados positivos foram identificados como MRSA. O perfil de suscetibilidade para estes isolados foi determinado pelo método de disco difusão. A tipagem molecular dos MRSA foi realizada pelas técnicas de PFGE, MLST, *spa* typing e SCC*mec* multiplex PCR. Utilizou-se regressão logística para o cálculo do *odds ratio* e respectivos intervalos de 95% de confiança. **Resultados:** Entre os 1.192 *swabs* coletados, 371 (31,1%) foram positivos para *S. aureus* e 14 (1,2%) foram identificados como MRSA. Os fatores independentemente associados ao portador nasal de *S. aureus* foram: crianças acima de dois anos de idade (OR=1,83; IC95% 1,27-2,65) e ter frequentado outra creche (OR= 1,48; IC95% 1,01-2,16). Alto grau de escolaridade da mãe foi um fator protetor para a colonização por *S. aureus* (OR=0,43; IC95% 0,23-0,80). Uma linhagem genética predominante foi identificada compreendendo 8 dos 14 MRSA isolados. Esta linhagem apresentou perfil de multirresistência, SCC*mec* tipo IIIA, ST239 e *spa* type t037, compartilhando 82,7% de similaridade genética com o Clone MRSA Brasileiro. Uma cepa MRSA foi classificada como SCC*mec* tipo V e ST1120. Esta cepa apresentou características genéticas de MRSA associados à comunidade embora tenha sido recuperada de criança com fatores de risco para aquisição de MRSA relacionado ao serviço de saúde. As demais cepas MRSA apresentaram composição genética bastante diversa. **Conclusões:** A prevalência de crianças de creches colonizadas pelo *S. aureus* é alta. Embora a prevalência para MRSA tenha sido baixa nessas crianças, elas representam “vetores” potenciais

de disseminação de MRSA para comunidade. A detecção de uma linhagem de MRSA circulando nos CMEIs e associada a serviços de saúde pode estar sinalizando uma rota de transmissão cruzada destes microrganismos entre hospitais e comunidade.



## ABSTRACT

**Objectives:** (i) to assess the prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) nasal carriage in children attending day-care centers (DCC) in the municipality of Goiânia; (ii) to determine the potential risk factors related to *S. aureus* carriage and MRSA; (iii) to characterize MRSA isolates circulating in DCCs using molecular typing methods.

**Methods:** Between August and December 2005, nasal swabs were collected from children who attended 62 DCCs. Clinical and socio-demographic information associated with the acquisition of *S. aureus* and MRSA were obtained through questionnaires applied to parents or guardians. The swabs were processed following the standard methods for identification and isolation of *S. aureus*. Amplification *femB* gene by polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the specie. The presence of *mecA* gene was detected by PCR and the positive isolates were identified as MRSA. Susceptibility to MRSA was determined by disk diffusion method. MRSA molecular typing was performed by PFGE, MLST, *spa* typing and *SCCmec* multiplex PCR.

**Results:** 371 (31.1%) out of the 1.192 collected swabs were positive for *S. aureus* and 14 (1.2%) were identified as MRSA. The factors independently associated with risks for nasal colonization by *S. aureus* were children higher than two years of age (OR = 1.83, 95% CI 1.27-2.65) and previous DCC attendance (OR = 1.48; 95% CI 1.01-2.16). Mother's high degree of education was a protective factor for *S. aureus* carriage (OR = 0.43, 95% CI 0.23-0.80). A multidrug resistant dominant MRSA lineage was identified comprising 8 out of the 14 MRSA isolates. This cluster was characterized as *SCCmec* type IIIA, ST239 and *spa* type t037 sharing 82.7% genetic similarity with the Brazilian clone. One MRSA strain was classified as *SCCmec* type V and ST1120. This strain showed features of CA-MRSA although it has been recovered from a healthy child who presented risk factors for HA-MRSA acquisition. The remaining MRSA strains showed a diverse genetic background.

**Conclusions:** Children attending DCCs are often colonized with *S. aureus* and although the prevalence of MRSA was low, they can represent potential vectors of spread of resistant pathogens to the community. The detection of a MRSA lineage circulating within DCCs suggests a two-way flow spread of MRSA between hospitals and community.

## **1.Introdução**

### **1.1. Agente etiológico**

O *Staphylococcus aureus* pertence ao gênero *Staphylococcus*, família *Micrococcaceae*, sendo o patógeno mais importante entre os estafilococos. Estes microrganismos são cocos gram-positivos, medindo de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, os quais podem apresentar-se isolados, aos pares, em cadeias curtas ou em grupos em forma de cachos irregulares. As células bacterianas de *S. aureus* são imóveis, não-esporuladas, desenvolvendo-se melhor em atmosfera aeróbia. Macroscopicamente, suas colônias em meio sólido são usualmente lisas e algo convexas com a borda contínua. Algumas colônias de *S. aureus* podem apresentar pigmentação amarelo ou amarelo-alaranjado, enquanto outras podem ser esbranquiçadas ou acinzentadas. *S. aureus* também podem produzir uma zona difusa de hemólise ao redor das colônias, evidenciada após incubação prolongada (Kloos, 1997; Koneman et al., 2006).

Desde a sua descoberta, em 1880 (Ogston, 1881), o *S. aureus* tem sido reconhecido como um dos principais patógenos humanos, reponsável por processos infecciosos que incluem infecções cutâneas, infecções do trato genito-urinário, infecções dos sistemas respiratório e nervoso central, bacteremias, doenças toxinogênicas e infecções associadas com dispositivos intravasculares. Adicionalmente, são importantes patógenos de infecções hospitalares e comunitárias (Cohen, 1986; Lowy, 1998).

### **1.2. Determinantes da colonização do *S. aureus***

O *S. aureus* é um constituinte da microbiota humana podendo ser isolado de múltiplos sítios corporais, sendo as narinas anteriores o nicho de colonização mais frequente (Kluytmans et al., 1997; Kluytmans & Wertheim, 2005). Cerca de 20 a 40% da população humana é portadora nasal de *S. aureus* (Bischoff et al., 2004; Wertheim et al., 2004; Mainous et al., 2006; van Belkum et al., 2009). Acredita-se que os mecanismos envolvidos na determinação do estado de portador nasal de *S. aureus* seja multifatorial, envolvendo características genéticas do hospedeiro, fatores bacterianos e ambientais (Cole et al., 2001; Peacock et al., 2001; Nouwen et al., 2004; Sivaraman et al., 2008). A colonização nasal é um evento dinâmico que pode ocorrer logo após o nascimento e durante toda a vida, favorecendo episódios de infecção. Vários estudos tem estabelecido uma relação causal entre portadores nasais de *S. aureus* e subsequente

desenvolvimento de infecções estafilocócicas, demonstrando, na maioria das vezes, que a cepa invasiva é indistinguível da cepa colonizadora (vonEiff et al., 2001; Nouwen et al., 2005; Creech et al., 2006; Huang et al., 2007a; Safdar & Bradley, 2008).

Estudos longitudinais têm distinguido pelo menos três perfis de portadores nasais em indivíduos saudáveis: (i) portadores persistentes, aproximadamente 20% da população que geralmente está colonizada com uma cepa única de *S. aureus* por longos períodos de tempo (ii) portadores transitórios, aproximadamente 30% da população que alberga várias cepas diferentes ao longo do tempo e (iii) não portadores, atingindo aproximadamente 50% da população que praticamente não é colonizada com o microrganismo. Esta distinção é importante uma vez que os portadores persistentes possuem uma carga microbiana mais elevada que os portadores transitórios resultando em riscos de infecção e dispersão aumentados. Sendo assim, a identificação dos portadores nasais assume papel fundamental na patogênese e epidemiologia destas infecções tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários (VandenBergh et al., 1999; Wertheim et al., 2005).

Portadores persistentes são mais comuns entre as crianças que os adultos. Nesta condição, elas representam vetores potenciais de disseminação bacteriana intra e interfamiliar, com uma estreita correlação do estado de portador entre os contactantes. Alguns estudos têm mostrado que a maioria dos indivíduos que convivem com um portador nasal de *S. aureus* compartilham cepas genotipicamente idênticas (Peacock et al., 2003; Herwaldt et al., 2003; Huijsdens et al., 2006; Lebon et al., 2008).

Vários fatores parecem ser determinantes para o estado de portador nas crianças saudáveis. A idade exerce grande influência neste processo, com prevalências de colonização mais consistentes nas crianças acima de dois anos de idade. Uma possível explicação para a baixa colonização nos primeiros anos de vida pode ser a competição entre *Streptococcus pneumoniae* e *S. aureus* ou interferência bacteriana com outros microrganismos presentes na cavidade nasal destas crianças (Regev-Yochay et al., 2004). Picos de prevalência de colonização por *S. pneumoniae* em crianças menores de dois anos e de *S. aureus* em crianças mais velhas (acima de três anos) têm resultado em uma correlação negativa para co-colonização entre estes patógenos (Bogaert et al., 2004; Cheng Immergluck et al., 2004). Número de irmãos mais velhos,

tamanho da família, amamentação, frequentar creches, mãe fumante e menor grau de instrução materno também têm sido associados com portador nasal de *S. aureus* (Peacock et al., 2003; Lebon et al., 2008).

Estudos mostram que crianças cuidadas por grupos não familiares apresentam índices elevados de colonização nasal com patógenos respiratórios e predisposição a doenças respiratórias, virais e bacterianas, quando comparadas com crianças cuidadas por familiares (Brady, 2005). Traços comportamentais que favorecem um estrito contato físico combinado com quantidades significativas de antibióticos para o tratamento destas infecções têm tornado as creches ambientes de seleção e amplificação de patógenos resistentes (Holmes et al., 1996; Cordell et al., 1997; Cordell et al., 1999; Huskins, 2000; Lu et al., 2005). Com o objetivo de identificar estudos que avaliaram a prevalência de portador nasal de *S. aureus* em crianças saudáveis que frequentam creches, procedeu-se a uma busca eletrônica nas bases de dados do MEDLINE ( National Library of Medicine) e Lilacs, cobrindo o período de janeiro de 1990 a março de 2009. Foram utilizados os seguintes descritores, de forma combinada, e sua correspondência em português: “Day-care center”, “*Staphylococcus aureus*”, “Children” e “Carriage”. A tabela 1 sumariza os resultados obtidos nos quais se observa grande variabilidade nas taxas de portador de *S. aureus* (13,4-48,7%). A maioria dos estudos são de amostras coletadas a partir do ano 2000 e procedentes do continente asiático, que mostram altas taxas de prevalência de *S. aureus* nasal.



Tabela 1. Estudo de portador nasal de *S. aureus* em crianças que frequentam creches em diferentes localidades geográficas.

Autor	Ano de coleta	Local	Espécime	Idade		População		Elegibilidade		<i>S. aureus</i>		Prevalência MRSA		MRSA entre <i>S. aureus</i>	
				Idade		População		Elegibilidade		<i>S. aureus</i>		Prevalência MRSA		MRSA entre <i>S. aureus</i>	
				N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Ásia</b>															
Masuda et al	1999	Japão	Swab nasal	1 m a 5 a	156	2 creches	28	17,9	12	7,7	42,9				
Hisata et al	2001 e 2002	Japão	Swab nasal	--	818	7 creches	231	28,2	35	4,3	15,1				
Huang et al	2001 e 2002	Taiwan	Swab nasal	--	262	1 creche 2 escolas	95	36,2	5	1,9	5,1				
Boyle-Vavra et al	2003	Taiwan	Swab nasal	≤ 12 a	640	3 creches	157	24,5	34	5,3	21,6				
Lo et al	2003-2005	Taiwan	Swab nasal	≤ 14 a	1.195	7 creches	300	25,1	89	7,4	29,6				
Lo et al	2004-2006	Taiwan	Swab nasal	1 m a 12 a	1.615	8 creches e ambulatório	323	20,0	131	8,1	40,5				
Lo et al	2007	Taiwan	Swab nasal	≤ 7 a	68	1 creche	17	25,0	9	13,2	53,0				
<b>Europa</b>															
Sá Leão et al	1996-1998	Portugal	Swab nasofaríngeo	0 – 5 a	2.111	16 creches	283	13,4	5	0,2	1,8				
Aires de Sousa et al	1996 e 1997	Portugal	Swab nasofaríngeo	0 – 5 a	1.331	16 creches	210	15,8	--	--	--				
Zemlickova et al	2004-2005	República Tcheca	Swab nasofaríngeo	3 – 6 a	425	16 creches	68	16,0	--	--	--				
<b>América</b>															
Acdock et al	1996	EUA	Swab nasal	4 m a 11 a	99	2 creches	--	--	11	11,1	--				
Torano et al	1997	Cuba	Swab nasal	≤ 5 a	358	3 creches	67	18,7	8	2,2	11,9				
Shahin et al	1997	Canadá	Swab nasal, garganta e perianal	1 – 7 a	161	1 creche	40	24,4	2	1,2	14,3				
Bernardo & Uno	2008	Brasil	Swab naal	1 – 6 a	76	2 creches	17	48,7	1	1,3	2,7				

-- Não disponível



### 1.3. Mecanismos de resistência a oxacilina

É provável que nenhum outro patógeno humano possua versatilidade de estratégias de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e de multiplicação em vários ambientes do que o *S. aureus*. O imenso “repertório” genético desta bactéria para adaptação a mudanças e ambientes hostis pode ser avaliado pelo surgimento de cepas resistentes logo após a introdução de antimicrobianos na prática clínica (Oliveira et al., 2002).

A penicilina foi introduzida na terapêutica clínica no começo da década de 40 e logo após sua introdução surgiram diversos relatos de cepas de *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano (de Lencastre et al., 2007). No final dos anos 40, mais de 50% de todos os isolados, tanto hospitalares quanto comunitários eram resistentes à penicilina (Thornsberry, 1988). Atualmente, a grande maioria dos *S. aureus* invasivos ou colonizadores são resistentes a este composto (Chambers, 2001; Diekema et al., 2001). Após o desenvolvimento da primeira penicilina semi-sintética resistente às  $\beta$ -lactamases (metecilina) e sua introdução na prática clínica em 1960, foi observado o mesmo fenômeno. Em 1961 surgiram as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à metecilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – MRSA) (Jevons, 1961). Desde então, os MRSA tornaram-se um desafio para a saúde pública mundial, por estarem amplamente disseminados em hospitais e comunidade.

Os antimicrobianos que pertencem a classe dos  $\beta$ -lactâmicos atuam inibindo as enzimas bacterianas responsáveis pela catalisação da reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptidoglicano, constituintes da parede celular. Estas enzimas foram denominadas de proteínas ligadoras da penicilina (*Penicillin Binding Protein* - PBP) por serem o sítio-alvo de ligação e possuírem alta afinidade com as penicilinas, análogos estruturais de seu substrato. Quatro PBPs já foram descritas para o *S. aureus* (Lim & Strynadka, 2002). As PBPs 1, 2, e 3 são essenciais para o crescimento celular e sobrevivência das cepas suscetíveis, sendo inibidas por concentrações muito baixas dos  $\beta$ -lactâmicos. A resistência surgiu pela produção de uma PBP adicional, PBP2a ou PBP2', uma proteína de 78-kDa, capaz de substituir a função das outras PBPs, sem prejuízos à síntese da parede celular na presença de concentrações destes compostos que seriam letais (Hartman & Tomasz, 1984; Ghuysen, 1994). Conseqüentemente, a resistência à metecilina conferiu resistência cruzada a todos os compostos  $\beta$ -lactâmicos (Chambers, 1997, Lowy, 2003).



A produção desta PBP está relacionada com a aquisição do gene *mecA*, parte integrante de um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec* – SCC*mec*). O SCC*mec*, também designado como ilha genômica ou ilha de resistência antimicrobiana, integra-se ao cromossomo bacteriano em uma sequência específica (*bacterial chromosomal attachment site, attBSCC*) localizada próxima à origem de replicação do *S. aureus*, na extremidade 3' de uma região de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) de função desconhecida, denominada *orfX* (Ito et al., 1999; Katayama et al., 2000; Ito et al., 2001; Okuma et al., 2002). Este elemento é um veículo bem adaptado para intercâmbio genético entre espécies estafilocócicas e parece desempenhar papel importante na sobrevivência das células bacterianas em ambientes “estressantes” (Hiramatsu et al., 2001; Katayama et al., 2003).

O SCC*mec* é composto pelo complexo do gene *mec* (gene *mecA* e seus reguladores) e pelo complexo do gene *ccr* que codifica recombinases responsáveis pela sua mobilidade. Todo o restante do material genético deste elemento é denominado região J (*junkyard*), que apesar de não possuir função definida, sua composição genética é utilizada para classificar o SCC*mec* em subtipos (Katayama et al., 2000; Ito et al., 2001; Katayama et al., 2001; Hiramatsu et al., 2002). O complexo do gene *mec* compreende o gene *mecA* (2,1kb), seus reguladores *mecI* e *mecRI* e a sequência de inserção IS431. O gene *mecI* e *mecRI* encontram-se localizados *upstream* ao *operon* do gene *mecA*. A proteína MecI codificada pelo gene *mecI* impede a transcrição do *mecA*, na ausência de agentes  $\beta$ -lactâmicos. Na presença destes compostos, o gene *mecRI* codifica uma proteína transdutora de sinal, MecRI, que cliva a MecI e induz a transcrição do gene *mecA* e subsequente produção de PBP2a. Os genes regulatórios podem estar truncados pelas sequências de inserção IS431 e IS1272, levando a desrepressão do gene *mecA* (Ito et al., 2001; Katayama et al., 2001; Berger-Bachi & Roher, 2002).

Os tipos de SCC*mec* têm sido definidos pela combinação particular da classe do complexo do gene *mec* e do tipo do complexo do gene *ccr*. Os tipos 1 a 4 do complexo do gene *ccr* foram descritos baseados na composição de cada um dos genes *ccrA* e *ccrB*: *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* (Ito et al., 2001; Ma et al., 2002). O tipo 5 foi descrito recentemente e é composto somente pelo gene da recombinase *ccrC* (Ito et al., 2004). Para o complexo do gene *mec*, cinco classes têm sido descritas de acordo com sua estrutura genética (Ito et al., 2003; Ito et al., 2004):

- Classe A: *mecI-mecRI-IS431*

- Classe B: IS1272- $\Delta$ *mecRI-mecA-IS431*
- Classe C: IS431- $\Delta$ *mecRI-mecA-IS431*
- Classe D:  $\Delta$ *mecRI-mecA-IS431*
- Classe E:  $\Delta$ *mecRI-mecA-IS431* (há uma deleção de 976 pb no *mecRI* comparada com a classe D)

Ainda há relatos dos subtipos A1-A4 para a classe A e C1-C2 para a classe C do complexo do gene *mec* (Lim et al., 2003; Shore et al., 2005).

Até o momento, seis tipos de SCC*mec* são reconhecidos: SCC*mec* tipo I (34,3 kb, classe B do complexo do gene *mec* e *ccrAB1*) detectado no primeiro MRSA isolado no Reino Unido em 1961; SCC*mec* tipo II (53,0 kb, classe A do complexo do gene *mec* e *ccrAB2*) identificado em uma cepa MRSA denominada N315 isolada no Japão em 1982; SCC*mec* tipo III (66,9 kb, classe A do complexo do gene *mec* e *ccrAB3*) descrito na cepa MRSA 85/2082 isolada na Nova Zelândia em 1985; SCC*mec* tipo IV (20,9-24,3 kb, classe B do complexo do gene *mec* e *ccrAB2*) identificado em cepas MRSA isoladas de infecções comunitárias na Austrália no começo da década de 90; SCC*mec* tipo V (classe C2 do complexo do gene *mec* e *ccrC*) descrito na cepa comunitária WIS da Austrália em 2004 e SCC*mec* tipo VI (classe C2 do complexo do gene *mec* e *ccrAB4*) identificado em cepas colonizadoras nasais em Portugal e diferenciado do tipo IV em 2006 (Ito et al., 2001; Daum et al., 2002; Ma et al., 2002; Ito et al., 2003; Hiramatsu et al., 2004; Ito et al., 2004; Oliveira et al., 2006a,b). De acordo com a figura 1, os SCC*mec* tipo I, IV, V e VI codificam exclusivamente resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos. O SCC*mec* tipo II contém o plasmídeo pUB110 e o transposon Tn554 integrados na região J. Este plasmídeo transporta o gene *ant* (4') que codifica resistência aos aminoglicosídeos (kanamicina, tobramicina e bleomicina) e o transposon que abriga o gene *ermA* responsável pela resistência constitutiva e induzível aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (Leclercq et al., 2002). O SCC*mec* tipo III foi recentemente reclassificado como um elemento composto constituído de dois componentes distintos: (i) o SCC*mec* contendo os complexos do gene *mec* e *ccr*, uma cópia do plasmídeo pT181 e do pseudo transposon  $\Psi$ Tn554 e (ii) um elemento SCC transportando uma recombinase específica (*ccrC*), uma cópia do plasmídeo pI258 e do transposon Tn554, denominado SCC*mercury*. O plasmídeo pI258 codifica resistência às penicilinas e metais

pesados como o mercúrio enquanto o plasmídeo pT181 codifica resistência às tetraciclinas. O transposon  $\Psi$ Tn554 codifica resistência ao cádmio (Chongtrakool et al., 2006; Kondo et al., 2007). Adicionalmente, os *S. aureus* podem transportar genes de resistência em outros sítios do genoma, fora destes elementos genéticos móveis, integrados diretamente no cromossomo ou em outros plasmídeos (Lindsay & Holden, 2006; Hanssen & Sollid, 2006).

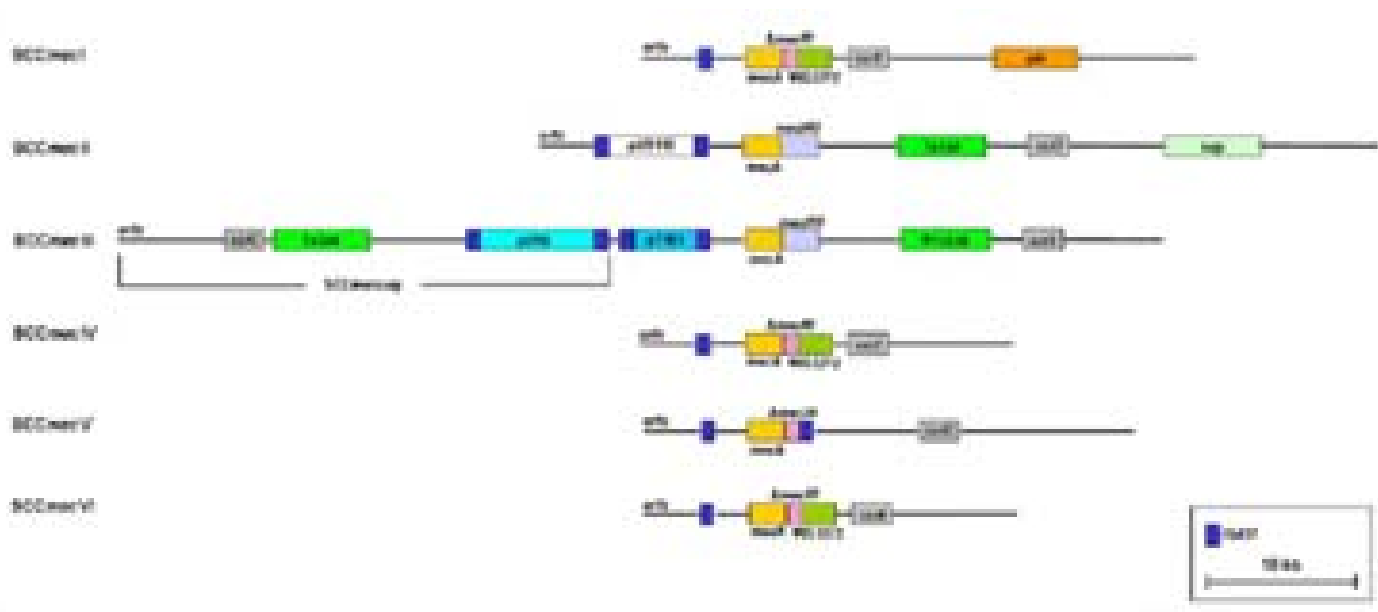


Figura 1: Esquema representativo da composição estrutural dos SCCmec tipos I a VI identificados em MRSA. Adaptado de Deurenberg & Stobberingh, 2008.

O nível de resistência fenotípica expressada para as cepas MRSA não parece estar relacionado com a quantidade de PBP2a produzida, sugerindo que a resistência à oxacilina é um fenômeno complexo, dependente do conteúdo genético (*genetic background*) da cepa em questão. Outros fatores além do gene *mecA* estão envolvidos na modulação desta resistência, os quais incluem genes cromossomais, localizados em numerosos sítios do genoma estafilocócico. Estes fatores são conhecidos como *fem* (*factor essential for methicillin resistance*) ou genes *aux* (*auxiliary*) e estão implicados na biossíntese do peptidoglicano. Constituintes de uma família de peptidil transferases não ribossomais (família FemABX), sintetizam sequencialmente um interpeptídeo de pentaglicina responsável pela ligação cruzada das cadeias de peptidoglicano da parede celular bacteriana em formação (Henze et al., 1993; Ehlert et al., 1997).

O operon *femAB* (genes *femA* e *femB*) codifica duas proteínas citoplasmáticas de 49 kDa, FemA e FemB, as quais compartilham alto grau de homologia de sequência. A inativação

destes genes reverte a resistência à oxacilina à níveis de suscetibilidade, além de prejudicar a produção do septo na separação das células-filhas, encurtar o interpeptídeo de pentaglicina e interferir com a secreção de fatores de virulência, que podem limitar a capacidade do *S. aureus* em causar infecção (Stapleton & Taylor, 2002; Hubscher et al., 2007). A presença destes dois genes, detectados quase que exclusivamente em *S. aureus*, vêm sendo incorporada nos protocolos da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para identificação de MRSA, como marcadores para confirmação da espécie *S. aureus* (Kobayashi et al., 1994; Jonas et al., 2002).

### 1.3.1. MRSA associados aos serviços de saúde (HA-MRSA)

A maioria dos MRSA relacionados às infecções em instituições de saúde (*healthcare-associated methicillin-resistant S. aureus*, HA-MRSA) tem sido associados com os SCCmec tipo I, II e III. Após o surgimento do primeiro MRSA em um hospital do Reino Unido, índices aumentados de MRSA foram observados em vários países europeus. Durante a década de 70, cepas MRSA disseminaram para a Austrália, Japão e Estados Unidos da América (EUA), sendo atualmente a principal causa de infecções nosocomiais no mundo (Grundmann et al., 2006). Entre 1997 e 1999, o Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY investigou a prevalência mundial de MRSA em hospitais verificando taxas de 23% na Austrália, 67% no Japão, 35% na América Latina, 40% na América do Sul, 32% nos EUA e 26% na Europa (Diekma et al., 2001; Bell & Turnidge, 2002). Entretanto, nos países da Europa, prevalências de MRSA menores que 1% são encontradas em países da região norte enquanto prevalências acima de 45% são observadas nos países da região sul (Tiemersma et al., 2004). No Brasil, desde a detecção de MRSA provenientes de pacientes hospitalizados (Marques et al., 1989), as taxas de prevalência têm aumentado alcançando 40 a 60% nos hospitais brasileiros (Oliveira et al., 2001; Beretta et al., 2004; Sader et al., 2004; Guilarde et al., 2006).

Os portadores nasais de MRSA têm sido identificados como um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções nosocomiais, uma vez que estas infecções podem ser de origem endógena (Cespedes et al., 2005). A maioria das infecções por HA-MRSA são nosocomiais e se manifestam como complicações de procedimentos hospitalares ou doenças de base resultando no aumento da morbidade, mortalidade e custos (Cosgrove et al., 2005;

Cosgrove, 2006; Kluytmans & Struelens, 2009). Estes patógenos são geralmente introduzidos no ambiente hospitalar por profissionais da saúde e/ou pacientes infectados ou colonizados por este agente. Uma vez estabelecido no ambiente, o MRSA dissemina-se rapidamente e com frequência torna-se o clone predominante, responsável pela manutenção dos elevados índices de infecções hospitalares (Cespedes et al., 2002; Davis et al., 2004). Além disso, um fluxo de disseminação bidirecional entre contactantes e profissionais da saúde tem sido determinante para a reintrodução do MRSA nos hospitais (Wagenvoort et al., 2005). Em instituições onde o MRSA é endêmico, aproximadamente 1-2% dos pacientes hospitalizados tornam-se colonizados e destes aproximadamente 40% desenvolvem um episódio de infecção estafilocócica (Boyce, 1992).

A colonização ou infecção por MRSA está associada a alguns fatores de risco que incluem histórico de hospitalização, realização de procedimentos cirúrgicos, admissão em unidades de terapia intensiva (UTI), uso de dispositivos invasivos, contato com indivíduos colonizados ou infectados com MRSA e residência em instituições de saúde (Centers for Disease Control and Prevention - CDC a). Pressão seletiva por uso prévio de determinados antimicrobianos parece ser um dos principais fatores de risco associados com a aquisição deste patógeno (Tacconelli, et al., 2008). As principais síndromes clínicas associadas com as doenças invasivas por MRSA geralmente são graves e incluem bacteremias, pneumonias, osteomielites e choque séptico. Variações nas frequências de MRSA relacionados às infecções nosocomiais dependem diretamente do sítio de infecção, da unidade de internação e da região geográfica em estudo (Klevens et al., 2007a).

### 1.3.2 MRSA associados à comunidade (CA-MRSA)

Nos anos 80, os primeiros casos de infecção por MRSA na comunidade foram relatados em grupos populacionais específicos como usuários de droga intravenosa, residentes em instituições de saúde e pacientes com frequente contato com instituições de saúde. Embora estas infecções tenham ocorrido na comunidade, foram consideradas infecções associadas à assistência à saúde, devido à presença dos fatores de risco para aquisição de MRSA (Saravolatz et al., 1982). Entretanto, no começo da década de 90, novas cepas MRSA foram isoladas de indivíduos aborígenes de comunidades remotas na Austrália, sem os tradicionais fatores de risco para aquisição de MRSA, sendo denominadas de CA-MRSA (*community-associated methicillin-resistant S. aureus*) (Udo et al., 1993). De fato, tem sido observado que os CA-MRSA têm evoluído a partir de duas populações distintas: (i) CA-MRSA isolados de indivíduos associados

com pelo menos um dos tradicionais fatores de risco para aquisição de MRSA e (ii) CA-MRSA verdadeiramente comunitários, isolados de indivíduos saudáveis sem qualquer exposição a esses fatores de risco (Enright, 2003). Dados de uma meta-análise revelaram que a maioria dos indivíduos colonizados com CA-MRSA possuía pelo menos um dos fatores de risco para MRSA e que a prevalência de CA-MRSA entre aqueles indivíduos sem fatores de risco era baixa (0,24%) (Salgado et al., 2003).

A mudança epidemiológica do MRSA tornou-se evidente quando infecções associadas a este patógeno começaram a ocorrer em crianças e adolescentes saudáveis. Estes isolados têm sido recuperados de diversos sítios de infecção ou colonização, frequentemente associados a surtos esporádicos em grupos específicos tais como populações indígenas, indivíduos encarcerados, desabrigados, homossexuais, militares, participantes de esportes coletivos e crianças que frequentam creches (Boyce, 1998; Groom et al., 2001; CDC, 2003a, b,c; Pan et al., 2003; Wang et al., 2004; Buescher, 2005; Tenover et al., 2006; Gorwitz et al., 2008). O traço comum destes grupos reside na alta intensidade de contato físico e condições precárias de higiene que podem amplificar a transmissão do patógeno na comunidade (Nguyen et al., 2005). A maioria das manifestações clínicas relacionadas com CA-MRSA são infecções de pele e subcutâneas, embora possam causar doenças invasivas, rapidamente progressivas e potencialmente fatais como pneumonia necrosante, sepse grave e fasciíte necrosante (Boyle-Vavra & Daum, 2007). A virulência diferenciada deste patógeno foi evidenciada pelos quatro casos fatais de crianças infectadas com CA-MRSA em Minnessota e Dakota do Norte, EUA, no ano de 1999 (CDC, 1999).

Diferentemente dos HA-MRSA convencionais, CA-MRSA possuem resistência antimicrobiana restrita aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, linhagens genótípicas não relacionadas aos MRSA hospitalares, SCC*mec* tipo IV e V e um fator de virulência denominado leucocidina de Pantón-Valentine (*Panton-Valentine Leukocidin* - PVL) (Naimi et al., 2003; Vandenesch et al., 2003; Tacconelli et al., 2004; Maltezou & Giamarellou, 2006; Tristan et al., 2007; Takano et al., 2008). Notavelmente, a grande diversidade clonal do CA-MRSA comparado com o HA-MRSA sugere que várias linhagens de *S. aureus* bem adaptadas à comunidade têm habilidade para tornarem-se CA-MRSA. Os genótipos destes isolados geralmente são distintos em diferentes localidades geográficas bem como heterogêneos dentro de uma região restrita (Okuma et al.,

2002; O'Brien et al., 2004; Nimmo et al., 2006; Coombs et al., 2006; Feng et al., 2008; Nimmo & Coombs et al., 2008).

Atualmente, não há uma terminologia única e consistente que identifique com precisão determinado isolado como CA-MRSA. Vários critérios têm sido utilizados para classificação dos isolados e/ou infecções como comunitárias (Salgado et al., 2003). Definições baseadas em informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes e das características microbiológicas do isolado têm sido propostas para a classificação de CA-MRSA. Epidemiologicamente, CA-MRSA tem sido definido como aquele isolado coletado de pacientes ambulatoriais ou até 48 horas após admissão hospitalar, excluindo-se os fatores de risco associados para infecções relacionadas com assistência em saúde (Centers for Disease Control and Prevention – CDC b; Salgado et al., 2003). Além disso, as técnicas de epidemiologia molecular têm sido consideradas imprescindíveis para definição de isolados como CA-MRSA (Shopsin et al., 2003).

Neste contexto, CA-MRSA têm emergido como um desafio na medicina pediátrica dada as prevalências aumentadas de infecções nesta população e as significativas taxas de morbimortalidade (Buescher et al., 2005). Várias investigações têm observado o aumento notável na frequência de recuperação deste patógeno tanto em crianças saudáveis (cepas colonizadoras) como de vários sítios de infecção, com taxas de prevalências variando de 1 a 17% para portadores nasais e aproximadamente 70% para algumas instituições pediátricas (Herold et al., 1998; Suggs et al., 1999; Shopsin et al., 2000; Hussain et al., 2000 e 2001; Nakamura et al., 2002; Creech et al., 2005; Lu et al., 2005; Mishaan et al., 2005; Huang et al., 2005; Alfaro et al., 2006; Vlack et al., 2006; Heininger et al., 2007; Huang et al., 2007b; Lo et al., 2007; Huang et al., 2008; Ko et al., 2008; Lo et al., 2008; Oguzkaya-Artan et al., 2008; Sdougkos et al., 2008). A taxa de colonização nasal de MRSA em crianças saudáveis que frequentam creches têm variado de 0,2 a 13%, sendo as maiores prevalências encontradas nos países do continente asiático (tabela 1).

Observa-se que o elevado potencial de virulência do CA-MRSA está associado com os determinantes da produção de PVL (genes *lukS*-PV e *lukF*-PV) e com os SCC*mec* tipos IV e V e que estes elementos ainda funcionariam como marcadores genéticos estáveis para classificação de CA-MRSA (Vandenesch et al., 2003; Moroney et al., 1997; Tristan et al., 2007). PVL é uma toxina *S. aureus* específica que atua preferencialmente sobre os leucócitos produzindo poros na membrana celular e conseqüente destruição tecidual (Diep & Otto, 2008). Esta relação entre PVL, SCC*mec* IV e V e CA-MRSA tem se confirmado em isolados provenientes dos EUA e

Taiwan onde estes patógenos parecem ser endógenos (Chen & Huang, 2005; Lo et al., 2006; Chen et al., 2007; Davis et al., 2007; Diep et al., 2008; Huang et al., 2008; Takano et al., 2008). Entretanto, alguns autores têm relatado que esta associação não é sustentável para todos os CA-MRSA como visto em isolados da Austrália, Irlanda e Coreia (O'Brain et al., 2004; Kim et al., 2007; Rossney et al., 2007; Karahan et al., 2008). Além disso, os determinantes da produção de PVL já foram relatados em CA-MRSA albergando os SCC*mec* tipos I, II e III, bem como em cepas de origem hospitalar (Deurenberg & Stobberingh, 2008).

O SCC*mec* tipo V foi recentemente descrito em amostras recuperadas de infecções de pele de indivíduos saudáveis de comunidades remotas na Austrália (Ito et al., 2004; O'Brien et al., 2005). Desde então, tem sido observado em CA-MRSA associados com diversas linhagens genéticas em localidades geográficas distintas. A tabela 2 sumariza os estudos que detectaram o SCC*mec* tipo V até o momento bem como suas principais características genéticas. A revisão bibliográfica foi realizada na base de dados MEDLINE a partir do ano em que o SCC*mec* tipo V foi descrito (2004), tendo como palavras-chaves: “SCC*mec* type V”, “Type V” e “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, utilizadas de forma combinada. Observa-se que grande parte das investigações que detectaram este tipo foram conduzidas em países asiáticos como Taiwan e Hong Kong, em pacientes hospitalizados e da comunidade, podendo estar ou não associados com os determinantes da PVL. É interessante notar que o SCC*mec* tipo V ainda não foi detectado no continente americano.





Tabela 2. Detecção do SCCmec tipo V por continente.

Autor	Ano de coleta	Local	Espécime	População		S. aureus		Prevalência MRSA		SCCmec	PVL <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>		
				Idade	N	Elegibilidade	N	%	N				%	MRSA entre S. aureus
<b>Ásia</b>														
Huang et al	2004-2005	Taiwan	Espécimes clínicos diversos	--	394	Crianças hospitalizadas	394	--	102 CA-MRSA 71 HA-MRSA	53,3	Frequente	ST59 ST239		
Lo et al	2004-2006	Taiwan	Swab nasal	≤ 12 a	1.615	Crianças de ambulatório	323	20	131	40,5	Frequente	--		
Huang et al (a)	1992-2005	Taiwan	Espécimes clínicos diversos	--	--	Crianças hospitalizadas	--	--	26 CA-MRSA 382 HA-MRSA	--	Frequente	ST59		
Huang et al (b)	2004-2005	Taiwan	Espécimes clínicos diversos Swab nasal	< 18 a	57	Crianças hospitalizadas Contactantes	--	--	18	32	Frequente	ST 59		
Huang et al (c)		Taiwan	Swab nasal	2 m a 5 a	3.046	Crianças de ambulatório	713	23	221	31	Frequente	ST 59		
Chen et al	2004-2005	Taiwan	Espécimes clínicos diversos	--	423	Crianças hospitalizadas	--	--	31	--	Frequente	ST 59		
Wang et al	2002-2005	Taiwan	Fluidos estéreis (sangue)	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	95	--	Frequente	ST 59		
Lu et al	2003-2005	Taiwan	Espécimes clínicos diversos Swab nasal	< 14 a	144 1.195	Crianças hospitalizadas Crianças em creches	67 300	46,5 25,1	77 89	53,5 7,4	Frequente	--		
Boyle-Yavra et al	2003	Taiwan	Espécimes clínicos diversos Swab nasal	< 12 a	16 640	Crianças hospitalizadas Crianças em creches	-- 157	-- 24,5	16 14	-- 5,3	Frequente	ST 59		
Ho et al (a)	2006-2007	Hong Kong	Swabs de ferida	2 a 97 a	298	Pacientes de serviços de emergência	126	42,3	21	6,4	Frequente	--		
Ho et al (b)	2005	Hong Kong	Swan nasal Swab lesão de pele	77 a 88 a	1563	Residentes de Instituições de saúde	--	--	80	5,1	Pouco frequente	ST45		

Autor	Ano de coleta	Local	Espécime	População			S. aureus			Prevalência			SCCmec	PVL <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>
				Idade	N	Eligibilidade	N	%	N	%	MRSA entre S. aureus				
											MRSA	%			
Ho et al (a)	2004-2005	Hong Kong	Swab lesão de pele	13 a 01 a	23	Pacientes hospitalizados	--	--	25	--	--	V (5 isolados)	Frequente	ST59	
Ho et al (b)	2005	Hong Kong	Swab nasal e axila Swab nasal Swab lesão de pele	--	46 949	Contactantes Residentes de Instituições de saúde	--	--	6 27	-- 2,8	--	V (13 isolados)	Pouco frequente	ST45 ST188	
Ito et al	2004	Japão				Descrição do tipo V isolado na Austrália									
<b>Oceania</b>															
Coombs et al	2003-2004	Austrália	Espécimes clínicos e de vigilância	--	--	Rede de Vigilância de MRSA	--	--	4.099	--	--	V (79 isolados)	Pouco frequente	ST45 ST59 ST573 ST5	
McDonald et al	2004-2005	Austrália	Swab lesões pele Swab de garganta	--	--	Crianças de comunidades remotas	283	--	66	--	23,3	V (1 isolado)	Pouco frequente	ST75	
O'Brien et al	2000-2004	Austrália	Swab nasal Espécimes clínicos diversos	--	--	Indivíduos da comunidade	--	--	17	--	--	V (16 isolados)	Pouco frequente	ST45 ST59 ST30 ST5	
<b>Europa</b>															
Aires de Sousa et al	2006	Portugal	Espécimes clínicos diversos	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	629	--	--	V (1 isolado)	Pouco frequente	ST45	
Luczak-Kadlubowska et al	2005	Polónia	Espécimes clínicos diversos	> 16 a	--	Pacientes hospitalizados	707	--	208	--	29,4	V (5 isolados)	Pouco frequente	CC39	
Kerttula et al (a)	1997-2004	Finlândia	Fluidos estéreis	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	4.091	--	--	V (149 isolados)	Pouco frequente	ST45 ST27	
Kerttula et al (b)	2003-2004	Finlândia	Swab de vigilância (nasal e pele)	--	76	Vigilância de surto em hospital	24	32	5	7	20,8	V (5 isolados)	Pouco frequente	ST27 ST8	
Wine et al	2007	Alemanha Áustria	Swab nasal Espécimes clínicos diversos	--	--	Pacientes hospitalizados Comunidade Animais domésticos	--	--	20	--	--	V (18 isolados)	Pouco frequente	ST398	
Gerogianni et al	2005	Grecia	Fluidos estéreis	4 a	--	Relato de caso	--	--	2	--	--	V	Frequente	--	

Autor	Ano de coleta	Local	Espécime	População				Prevalência				PVL <sup>a</sup>	SCC <sub>mec</sub>	ST <sup>b</sup>	
				Idade	S. aureus		MRSA		MRSA entre S. aureus %	PVL <sup>a</sup>	SCC <sub>mec</sub>				ST <sup>b</sup>
					N	Elegibilidade	N	%							
Deurenberg et al	1999-2004	Eurégio Meuse-Rhine	Espécimes clínicos diversos	--	Pacientes hospitalizados	--	--	152	--	--	V (1 isolado)	Pouco frequente	CC5		
Chmelnitsky et al	2002-2005	Israel	Espécimes clínicos diversos	--	Pacientes hospitalizados	--	--	25	--	--	V (5 isoaldos)	Pouco frequente	--		
Kilic et al	2003-2006	Turquia	Espécimes clínicos diversos	--	Pacientes hospitalizados	--	--	385	--	--	V (20 isolados)	Pouco frequente	--		
Karahan et al	2003-2005	Turquia	Espécimes clínicos diversos	--	Pacientes hospitalizados	--	--	261	--	85,9	V (8 isolados)	Pouco frequente	--		

<sup>a</sup> Panton Valentine Leukocidin

<sup>b</sup> Sequence Type associado ao SCC<sub>mec</sub> tipo V

-- Não disponível



Em Taiwan, evidências de uma linhagem de CA-MRSA homogênea e dominante, constituída por *Sequence Type* (ST) 59 e *SCCmec* tipo V<sub>T</sub>, uma variante do tipo V (Boyle-Vavra et al., 2005) responsável pela vasta maioria das cepas colonizantes e invasivas, contrapõe-se aos isolados subsequentemente identificados na região australiana e alguns países europeus que apresentam maior diversidade genotípica (Feng et al., 2008).

Recentemente, uma nova mudança no cenário epidemiológico do CA-MRSA têm sido observada com a migração destes patógenos para o ambiente hospitalar suplementando os tradicionais clones multirresistentes nosocomiais. Infecções por CA-MRSA têm sido frequentemente relatadas em pacientes hospitalizados, associadas a fatores de risco para infecções em instituições de saúde e sem relação aparente com a aquisição do patógeno na comunidade (Kertulla et al., 2005; Seybold et al., 2006; Huang et al., 2007c; Klevens et al., 2007b; Maree et al., 2007; Munckhof et al., 2008; Valentini et al., 2008; Popovich et al., 2008). No Brasil, os primeiros casos de CA-MRSA associados a infecções hospitalares foram isolados de pacientes com bacteremia em hospitais do Rio Grande do Sul (Ribeiro et al., 2005). Desde então, vários relatos têm documentado a disseminação de clones *SCCmec* tipo IV nos hospitais brasileiros (Trindade et al., 2005; Vidal et al., 2009).

*SCCmec* tipo IV e V são relativamente os menores elementos genéticos descritos até o momento e esta característica parece contribuir para a transferência horizontal destes elementos e consequente disseminação entre diversas linhagens genéticas. Adicionalmente, estes isolados possuem um *fitness* (tempo de geração mais rápido e um painel de fatores de virulência) que parecem favorecer a transmissibilidade e adaptabilidade a diversos ambientes como hospitais e comunidade (Robinson & Enright, 2004; Monecke et al., 2007; Diep et al., 2008). Por outro lado, *SCCmec* tipos I, II e III parecem ter encontrado vias de escape e adaptação do confinamento hospitalar para a comunidade, sendo relatados em indivíduos saudáveis sem exposição prévia aos fatores de risco para sua aquisição. (Sá-Leão et al., 2001; Charlebois et al., 2002; Ko et al., 2008). Este intercâmbio genético e epidemiológico do MRSA deve ser esperado em um futuro próximo e recebido como um alerta pela comunidade médica e científica, uma vez que a clássica distinção entre HA-MRSA e CA-MRSA está tornando-se cada vez mais difícil e imprecisa. Sendo assim, novas propostas de categorização de MRSA têm sido sugeridas como cepas “multirresistentes” e “não-multirresistentes”.

#### 1.4. Clones internacionais de MRSA

Métodos de tipagem são ferramentas úteis que podem ser utilizadas para estabelecer relações clonais e evolucionárias entre os isolados e traçar/rastrear a disseminação de clones bacterianos. Atualmente, a classificação de isolados é baseada principalmente em métodos moleculares que usualmente fornecem melhor poder discriminatório do que os métodos fenotípicos (Trindade et al., 2003; Liao et al., 2006). Inicialmente, a classificação dos clones internacionais de MRSA foi baseada em uma combinação de métodos moleculares específicos como *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e análise de plasmídeos (*band-based typing methods*) (Oliveira et al., 2001). PFGE é considerado o método “*gold standard*” para avaliação de similaridade genética e clonalidade entre isolados devido ao seu elevado poder discriminatório (Tenover et al., 1995). Recentemente, com a disponibilidade e acessibilidade a tecnologia de sequenciamento do DNA, vários métodos de tipagem baseados em sequenciamento (*sequenced-based typing methods*) têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados, tais como *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *spa type*, principalmente para caracterização de *S. aureus*.

MLST baseia-se na análise de sequências de fragmentos de sete genes constitucionais (*housekeeping*) do *S. aureus*. Um alelo distinto é atribuído a cada uma das diferentes sequências de cada gene resultando em um perfil alélico designado como tipo de sequência (*sequence type* – ST). Isolados que compartilham mais de cinco alelos idênticos são agrupados em um mesmo complexo clonal (CC) (Enright et al., 2000). Atualmente, a maioria dos clones circulantes de MRSA estão agrupados em cinco grandes linhagens distintas: CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45 (Enright et al., 2002). *spa type* é um método de sequenciamento de um único *locus* que determina as variações na sequência da região polimórfica X do gene da proteína de superfície A (*spa gene*) do *S. aureus*. A diversidade do gene *spa* consiste no número de pequenas sequências de repetição (*repeats*) contidas na região X. De acordo com o número e tamanho (21, 24 ou 27 bp) dos *repeats*, um *motif* é gerado com o *spa type* correspondente (Shopsin et al., 1999; Harmsen et al., 2003). O diferencial destes métodos reside na imparcialidade e portabilidade dos resultados, os quais podem ser inseridos em bases de dados digitais (<http://www.mlst.net> e <http://www.ridom.de/spaserver/>) permitindo comparações entre sequências de *S. aureus* descritas em diferentes partes do mundo. A concordância entre estes métodos aliados ao PFGE tem sido notável (Faria et al., 2008; Strommenger et al., 2008). Após a descoberta do SCCmec por

Katayama e colaboradores (2000), protocolos de identificação dos tipos de *SCC<sub>mec</sub>* foram desenvolvidos e incorporados aos estudos de epidemiologia molecular de MRSA (Oliveira & de Lencastre, 2002). A combinação destes métodos tem aprimorado a classificação do MRSA permitindo estabelecer relações filogenéticas de ancestralidade dos grandes clones epidêmicos de MRSA.

As cinco principais linhagens de MRSA descritas inicialmente foram designadas como clones epidêmicos pela habilidade de causar infecções, persistir localmente e se disseminar através de distintas regiões geográficas, inclusive entre continentes. Os cinco clones epidêmicos de MRSA (EMRSA) foram denominados de acordo com a região na qual eles foram inicialmente detectados ou com alguma propriedade epidemiológica característica de determinada linhagem, sendo conhecidos como: ibérico, epidêmico brasileiro (CEB), húngaro, Nova Iorque/Japão e pediátrico (Oliveira et al., 2002; Gomes et al., 2006).

O clone ibérico foi primeiramente descrito em 1989, relacionado com um surto em um hospital de Barcelona, Espanha (Dominguez et al., 1994; Sanches et al., 1995). Caracterizado como ST247-MRSA-I este clone tem disseminado entre vários países europeus incluindo Portugal, Itália, Reino Unido, Alemanha, Bélgica, Suíça, França e nos EUA (Oliveira et al., 2002). Entretanto, a partir da década de 90, ele vem sendo gradativamente substituído por outras linhagens clonais, incluindo o clone brasileiro, em hospitais da Espanha e Portugal (Cuevas et al., 2007).

Os primeiros representantes do clone epidêmico brasileiro foram isolados na cidade de São Paulo, Brasil, em 1992 (Sader et al., 1994). É um dos principais clones multirresistentes caracterizado como ST239-MRSA-III, tendo sido documentado entre os cinco continentes. Na América Latina, elevadas prevalências do mesmo foram observadas em instituições de saúde da Argentina, Chile, Uruguai e México. Adicionalmente, foram relatados em Portugal, Espanha, Itália, Grécia, República Tcheca, China e Taiwan (Aires de Sousa et al., 2001, Oliveira et al., 2002; Aires de Sousa et al., 2003a,b). No Brasil, os primeiros estudos que identificaram este clone já indicavam sua predominância entre os MRSA genotipados (Branchini et al., 1993; Teixeira et al., 1995). Esta notável habilidade de disseminação foi corroborada por estudos adicionais com elevadas taxas de prevalência alcançando mais de 80% em vários hospitais brasileiros, de norte a sul do país (Oliveira et al., 2001; Soares et al., 2001; Vivoni et al., 2006). A predominância deste clone foi marcadamente observada na década de 90 e estudos recentes



indicam que o mesmo vem sendo paulatinamente substituído por outras linhagens locais ou internacionais em hospitais da Europa, principalmente em Portugal e República Theca (Melter et al., 2003; Aires de Sousa et al., 2008).

O clone húngaro foi encontrado extensivamente disseminado entre hospitais de diversas localidades na Hungria, provenientes de pacientes infectados ou colonizados (de Lencastre et al., 1997). Caracterizado como um clone multirresistente ST239-MRSA-III, foi agrupado no mesmo complexo clonal que o clone brasileiro (CC8) por compartilharem relações de ancestralidade comum (Enright et al., 2002). Recentemente este clone foi identificado em países asiáticos como Taiwan (Aires de Sousa et al., 2003a).

O clone Nova Iorque/Japão foi inicialmente identificado como uma linhagem dominante de MRSA em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque e algumas localidades adjacentes como Pensilvânia, Connecticut e Nova Jérsei e concomitantemente em um hospital em Tóquio, Japão (Roberts et al., 1998). Relatos adicionais documentaram disseminação do mesmo em hospitais de Miami, Flórida (Chung et al., 2004). Recentemente, este clone foi observado em pacientes infectados de hospitais húngaros e mexicanos, substituindo outras linhagens de MRSA previamente dominantes (Conceição et al., 2007). É um clone multirresistente caracterizado como ST5-MRSA-II compartilhando o mesmo genótipo com a maioria dos isolados de *S. aureus* com sensibilidade intermediária a vancomicina (VISA) e com os isolados resistentes a vancomicina (VRSA) detectados até o momento no Japão e EUA, respectivamente (Hiramatsu et al., 1997; CDC, 2002). O primeiro caso de MRSA similar ao clone Nova Iorque/Japão no Brasil, foi descrito em paciente colonizado em um hospital do Rio de Janeiro (de Miranda et al., 2007).

As amostras do clone pediátrico foram inicialmente identificadas em 1992 por pesquisadores de Portugal e receberam esta denominação por terem sido isoladas de instituições pediátricas (Sá-Leão et al., 1999). Atualmente, os isolados do clone pediátrico podem ser classificados tanto como SCCmec tipo IV ou SCCmec tipo VI por possuírem *ccrAB2* ou *ccrAB4*, respectivamente (Oliveira et al., 2006a). É comumente caracterizado como ST5-MRSA-IV com um perfil único de resistência restrita aos agentes  $\beta$ -lactâmicos. No Brasil, a presença deste clone tem sido relatada em MRSA associados à colonização e não à infecção, em pacientes provenientes de hospitais ou profissionais da saúde de atendimento médico domiciliar, nas cidades do Rio de Janeiro e Recife (Melo et al., 2004; Rozenbaum et al., 2006; de Miranda et al., 2007).

Pesquisadores norte-americanos na tentativa de estabelecer um banco de dados nacional de perfis genotípicos de *S. aureus* e identificar as maiores linhagens de MRSA circulantes no país, propuseram uma nova classificação para as linhagens dominantes de MRSA levando em conta a combinação dos principais métodos moleculares disponíveis (McDougal et al., 2003). Juntamente com as amostras de MRSA coletadas nos EUA, diversas linhagens identificadas em outros países e representantes dos clones internacionais supracitados foram comparados. Como foram encontrados perfis genotípicos similares aos dos clones internacionais, estes foram reclassificados de acordo com a nova nomenclatura em: USA100 (clone Nova Iorque/Japão), USA500 (clone ibérico) e USA800 (clone pediátrico). A ausência do clone brasileiro na coleção investigada não permitiu que o mesmo recebesse uma denominação específica. USA300 e USA400 foram as denominações recebidas por duas linhagens distintas associadas a infecções comunitárias e amplamente disseminadas nos EUA.

Os primeiros clones de CA-MRSA foram descritos na Austrália, na década de 90, em populações indígenas de comunidades remotas, apresentando sensibilidade somente aos compostos  $\beta$ -lactâmicos e denominados de *Western-Australia* MRSA (WA-MRSA). Posteriormente, um segundo clone foi observado em vários estados australianos e na Nova Zelândia, sendo designado de SWP-MRSA (*South West Pacific* MRSA) e um terceiro, na região australiana de Queensland, associado a infecções comunitárias (Nimmo et al., 2006). Tomados juntos, estes clones são conhecidos como OSPC (*Oceania South Pacific Clone*) caracterizado como ST30-MRSA-IV e seus subtipos, sensíveis a maioria dos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos (Nimmo & Coombs et al., 2008).

Atualmente, a maioria das infecções por CA-MRSA no mundo são causadas por cepas pertencentes a cinco linhagens clonais. Clone ST1-MRSA-IV (USA400) disseminado nos EUA, onde foi inicialmente descrito, Ásia e Europa; clone ST30-MRSA-IV (USA1100 - OSPC), descrito inicialmente na Austrália e encontrado em países da Europa e América do Sul; clone ST80-MRSA-IV (clone europeu), importante causa de doenças endêmicas em comunidades européias, encontrado também na Ásia e Oriente Médio e clone ST59-MRSA-IV ou V<sub>T</sub>, recentemente documentado como uma linhagem endêmica de Taiwan, similar ao perfil genotípico do USA1000 (Deurenberg & Stobberingh, 2008). O clone ST8-MRSA-IV (USA300) é considerado uma linhagem pandêmica nos EUA, encontrado disseminado por mais de 38 estados norte-americanos, no Canadá e vários países europeus. Este clone tem sido implicado em

infecções graves como endocardites, pneumonia, sepse e fasciíte necrosante. Notavelmente, a introdução do mesmo em novas áreas geográficas tem sido observada com a substituição dos clones localmente endêmicos de CA-MRSA podendo acometer acima de 50% de todas as infecções estafilocócicas em algumas localidades (Diep et al., 2008; Tenover et al., 2008). As primeiras amostras de isolados caracterizados molecularmente como CA-MRSA no Brasil foram identificadas em infecções da corrente sanguínea e associadas ao clone OSPC em pacientes hospitalizados na região sul e sudeste do país (Ribeiro et al., 2005; Trindade et al., 2005).

Acredita-se, portanto, que o sucesso epidemiológico do MRSA possa estar reservado aos *genetic background* únicos de um número surpreendentemente limitado de linhagens de *S. aureus* particularmente bem adaptadas a uma disseminação sustentável nos ambientes clínicos e comunitários contemporâneos.

As investigações conduzidas sobre a epidemiologia molecular do MRSA no Brasil são apresentadas na tabela 3. Para a construção desta tabela procedeu-se a uma busca eletrônica nas bases de dados MEDLINE e Lilacs abrangendo o período do ano 2000 a 2009, utilizando-se os descritores: “SCC*mec* typing”, “Sequence Type”, “Multilocus Sequence Type”, “MLST”, “*Staphylococcus aureus*”, “MRSA” e “Brazil”, utilizados de forma combinada. Observa-se que: (i) os estudos se iniciam após o ano 2000; (ii) são conduzidos, em sua maioria, nas regiões sudeste e sul e em pacientes adultos hospitalizados; (iii) são utilizados diversos espécimes clínicos, particularmente amostras da corrente sanguínea, e (iv) os tipos de SCC*mec* mais frequentemente encontrados são os tipos IIIA e IV. Os dados mostram que o SCC*mec* III está associado ao clone brasileiro. A exiguidade destes estudos pode estar subestimando a identificação de linhagens clonais internacionais, bem como a detecção de clones locais endêmicos os quais podem estar contribuindo com a elevada prevalência destes patógenos no país.

Tabela 3. Estudos de epidemiologia molecular de MRSA realizados no Brasil.

Autor	Período	Espécime	População			S. aureus		Prevalência MRSA		SCCmec	PVL <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>
			Idade	N	Elegibilidade	N	%	N	%			
Ribeiro et al	2002-2003	Espécimes clínicos diversos	--	394	Pacientes Hospitalizados	--	--	5	--	IV	--	ST30
Trindade et al	2004	Espécimes clínicos diversos	3 a 70 a	--	Pacientes hospitalizados	--	--	20	--	IV	--	--
Rozebaum et al	2001	Swab nasal	1 a 98 a	1.656 amostras	Residentes IS <sup>c</sup> Contactantes Profissionais da saúde	--	--	10 2 16	--	III A IV	--	--
Vivoni et al	1999-2000	Espécimes clínicos diversos	13 a 90 a	87	Pacientes Hospitalizados	89	--	32	37	III IV	--	CC8 ST5
Lamaro-Cardoso et al	2000-2001	Swab nasofaríngeo	< 5 a	686	Crianças de ambulatório	93	13,5	7	1,02	III	--	--
de Miranda et al	2002-2003 e 2005	Espécimes clínicos diversos	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	81	--	III A IV	Pouco frequente	--
Ribeiro et al	2004-2006	Espécimes clínicos diversos	3 a 56 a	--	Pacientes hospitalizados	--	--	13	--	IV	Frequente	--
Reinert al	1995-1999	Espécimes clínicos diversos	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	50	--	III IV	Pouco frequente	ST239 ST3 ST5 ST88 --
Perez e D'Azevedo et al	2004	Fluidos estéreis	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	68	--	III	--	--
Vidal et al	2002-2003	Fluidos estéreis	--	--	Pacientes hospitalizados	--	--	29	--	IV	--	ST5 ST97 ST8 ST11

<sup>a</sup> Panton Valentine Leukocidin

<sup>b</sup> Sequence Type

<sup>c</sup> Instituição de Saúde

-- Não disponível



## 2. Justificativa

Evidências genéticas têm sustentado a relação causal entre portador nasal de *S. aureus* e MRSA e doença estafilocócica invasiva. As crianças, comumente colonizadas por estes patógenos, exercem papel fundamental na patogênese e epidemiologia destas infecções por apresentarem risco elevado de desenvolver infecções e atuarem como vetores potenciais de disseminação do microrganismo tanto em ambientes hospitalares como comunitários.

Neste contexto, este trabalho dá continuidade aos estudos anteriores de portador nasal de MRSA em crianças de Goiânia. Em estudo anterior analisamos a prevalência de *S. aureus* em crianças menores de cinco anos de idade com infecções respiratórias agudas e meningites, no contexto de um programa de vigilância prospectiva conduzido no município de Goiânia. Foi detectado uma prevalência de portador nasal de *S. aureus* de 13,5% e de MRSA de 1,02%. Os MRSA isolados apresentaram uma linhagem genética única associada a um perfil de multirresistência que não se assemelhava epidemiologicamente com o representante do clone epidêmico brasileiro (Lamaro-Cardoso et al., 2007).

Estes resultados, aliados à escassez de estudos de portador nasal de *S. aureus* e MRSA no Brasil, suscitaram vários questionamentos como: a necessidade de se obter dados nacionais para o desenvolvimento de medidas educacionais e de controle alinhadas à realidade epidemiológica do Brasil e o entendimento das peculiaridades epidemiológicas locais visando minimizar a disseminação de MRSA na população pediátrica do município.

Esta tese é constituída de uma revisão da literatura sobre o tema e a descrição da metodologia utilizada para obtenção dos resultados. Os resultados e discussão são apresentados sob a forma de dois artigos científicos que se encontram nos anexos:

- First report of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Type V in the American continent.
- Molecular epidemiology and risks for *Staphylococcus aureus* and MRSA nasal carriage in infants attending day-care centers in Brazil.

### 3. Objetivos

- Estimar a prevalência e fatores de risco associados ao portador nasal de *S. aureus* e MRSA em crianças menores de cinco anos de idade de creches do município de Goiânia.
- Caracterizar por métodos de tipagem molecular os MRSA isolados;
- Avaliar o relacionamento genético entre as diferentes cepas MRSA circulantes em creches do município.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Área e população de estudo**

O estudo foi conduzido entre agosto e dezembro de 2005 em Goiânia, capital do Estado de Goiás, situada na região central do Brasil. Goiânia conta com 1.201.007 habitantes (MS, DATASUS, 2005), e vem apresentando acelerado ritmo de crescimento ao longo dos últimos dez anos (IBGE, 2002). Uma vigilância prospectiva de portadores de *S. aureus* e MRSA foi conduzida com crianças de dois a cinquenta e nove meses de idade, atendidas em 62 das 70 creches (Centros Municipais de Educação Infantil - CMEIs) do município. Crianças foram consideradas não elegíveis se tivessem tomado antibiótico nos últimos sete dias. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) (processo nº 054/2005). O consentimento livre e esclarecido, por escrito, foi obtido dos pais ou responsáveis pelas crianças.

### **4.2. Coleta de dados**

Informações sobre as características sócio-demográficas da família e potenciais fatores de risco para *S. aureus* foram obtidas por meio de entrevistas com os pais ou responsáveis pela criança. Foram obtidas informações sobre idade da criança, gênero, tamanho da família, número de irmãos, além de aspectos relacionados à saúde como: ocorrência de febre, uso de antibiótico nos últimos 30 dias, hospitalização por alguma razão nos últimos três meses, presença de pneumonia no mês anterior e número de episódios de otite média aguda (OMA) nos últimos 12 meses. As entrevistas foram realizadas utilizando um formulário padronizado (Anexo). Os pesquisadores foram previamente treinados para condução da entrevista e aplicação do questionário.

### **4.3. Amostragem e tamanho da amostra**

O total de crianças que frequentam os CMEIs compuseram a população alvo do estudo. Cada CMEI forneceu a lista com a relação nominal das crianças. A seleção foi realizada por amostragem consecutiva, ponderada pelo tamanho da creche, até se alcançar o número amostrado para aquela creche. Baseado em estudos prévios (Creech et al., 2005; Hista et al., 2005), estimou-se uma taxa de portador de *S. aureus* de 30%. Portanto, calculou-se que uma



amostra com 1.100 crianças seria suficiente para estimar riscos de colonização por *S. aureus* e MRSA (prevalência estimada variando de 1 a 3%) com intervalo de 95% de confiança (efeito do desenho = 1,5).

#### **4.4. Coleta de *swab* nasal e procedimentos microbiológicos**

Após a obtenção do consentimento dos pais ou responsáveis, duas enfermeiras treinadas coletaram os swabs nasais os quais foram acondicionados em meio modificado de Stuart para transporte (Medical Wire & Equipment, Corsham, UK) e encaminhado ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, para processamento imediato. O isolamento foi realizado pela semeadura das amostras em ágar manitol salgado (Difco, Detroit, Mich.) e posterior incubação a 37°C por 24-48 horas. A identificação do *S. aureus* foi realizada conforme metodologia padronizada por Brown e colaboradores (2005). Colônias que apresentavam um halo amarelado pela fermentação do manitol e com morfologia sugestiva de estafilococos (colônias lisas, redondas, cremosas, coloração variando de acinzentada a amarelada) foram submetidas às provas de identificação de *S. aureus*. Estas provas incluíram coloração de Gram, catalase, coagulase em tubo e DNase. Todos os isolados coagulase e DNase positivos identificados como *S. aureus* foram inoculados em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth* - Difco) suplementado com 20% de glicerol e estocados a -80°C para provas adicionais.

#### **4.5. PCR para detecção do gene *mecA***

A detecção do gene *mecA* foi utilizada como marcador para identificação de MRSA. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o método de extração por fervura, com modificações (Aires de Sousa et al., 2007). Os isolados MRSA foram inoculados em placas de TSA (*Trypticase Soy Agar* – Difco) e incubados por 24 horas a 37°C. Três a quatro colônias bacterianas foram suspensas em 50 µL da solução tampão Tris-EDTA 1x (Tris 10mM, pH 7,5 e EDTA 1mM, pH 8,0) com 1 µL de lisostafina (10 mg/mL) (Sigma, St. Louis, Mo, EUA). A suspensão foi aquecida a 95°C por 15 minutos e um volume de 150 µL de água MiliQ esterilizada adicionado à suspensão. Após uma centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi utilizado como DNA *template* para a reação de PCR.

Os *primers* utilizados para amplificação do gene *mecA* foram:

MECA-P4: 5'- TCCAGATTACAACCTTCACCAGG – 3'

MECA-P7: - 5'- CCACTTCATATCTTGTAACG – 3'

A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>); 80 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (MBI Fermentas, Hanover, MD); 0,25 µM de cada primer; 1 U de *AmpliTaq* DNA polimerase (Applied Biosystems) e 20 ηg do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany) seguindo o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 4 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até a sua análise por eletroforese.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Borato-EDTA 1X por 30 minutos a 120V. O marcador de 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi utilizado como padrão de peso molecular, o DNA da cepa JP224, como controle positivo e água MiliQ esterilizada como controle negativo. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

#### 4.6. PCR para detecção do gene *femB*

A amplificação do gene *femB* foi realizada para confirmar a espécie de todos os MRSA isolados seguindo protocolo sugerido por Jonas e colaboradores (1999). As sequências dos *primers* utilizados foram:

FemB1 (F<sub>06</sub>): 5' – TTACAGAGTTAACTGTTACC – 3'

FemB2(F<sub>07</sub>): 5' – ATACAAATCCAGCACGCTCT – 3'

O método de extração do DNA genômico foi descrito no item 4.5. A mistura de reação foi preparada em um volume final de 30 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>); 80 µM de cada dNTP (MBI Fermentas, Hanover, MD); 0,25 µM de cada primer; 1 U de *AmpliTaq* DNA polimerase (Applied Biosystems) e 20 ηg do DNA *template*. Para a reação de amplificação utilizou-se o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 2 minutos a 72°C no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany). Os tubos de PCR foram

mantidos a 4°C até o momento da eletroforese. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Borato-EDTA 1X por 90 minutos a 90V. Os géis foram visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografados sob transiluminação ultravioleta.

#### **4.7. Teste de suscetibilidade - Disco Difusão**

Todos os MRSA identificados foram submetidos ao teste de disco difusão, conforme preconizado pelo CLSI (CLSI, 2007). Após subcultivos em agar nutriente por 24 horas a 37°C, um inóculo padrão de  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL (metade da turbidez da escala 1,0 de MacFarland) foi utilizado para a semeadura das placas de agar Müller-Hinton com o auxílio de um *swab* estéril. Sobre as placas já inoculadas foram depositados discos de antimicrobianos. Os discos de antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) utilizados foram: cefoxitina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, quinupristina-dalfopristina, vancomicina, teicoplanina, linezolida, sulfametoxazol-trimetoprim, penicilina, ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol e rifampicina. O controle de qualidade foi realizado com as cepas ATCC de *S. aureus* 25923 e 29213. A leitura dos halos de inibição foi realizada segundo os critérios do CLSI (CLSI, 2007).

A caracterização molecular dos isolados identificados como MRSA foi conduzida sob a orientação da Professora Dra. Hermínia de Lencastre no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal, na etapa do Doutorado sanduíche (Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE/CAPES – 2366/01) no período de novembro de 2006 a julho de 2007.

#### **4.8. PCR múltiplex para tipagem do SCC<sub>mec</sub>**

O tipo de SCC<sub>mec</sub> foi determinado utilizando-se a metodologia de PCR múltiplex seguindo protocolo desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2002). Foram selecionados oito *loci* (A-H) baseados nas sequências do elemento *mec* previamente descritas (Ito et al., 1999; Ito et al., 2001; Oliveira et al., 2001). O *locus* A está localizado *downstream* ao gene *pls*, específico para o SCC<sub>mec</sub> tipo I; o *locus* B é um fragmento interno do operon *kdp*, o qual é específico para o SCC<sub>mec</sub> tipo II; o *locus* C é um fragmento interno do gene *mecI* presente nos SCC<sub>mec</sub> tipo II e III; o *locus* D é um fragmento interno da região *des*, presente nos SCC<sub>mec</sub> tipo I, II e IV; o *locus*

E está localizado na região entre o plasmídeo pI258 e o transposon Tn554, específico para o SCC*mec* tipo III; o *locus* F, que também é específico para o SCC*mec* tipo III, está localizado na região entre o Tn554 e a junção cromossômica direita (*orfX*); o *loci* G e H foram incluídos para distinguir as variantes estruturais IA e IIIA, respectivamente; o *locus* G corresponde a junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110, específico para a variante estrutural IA devido a presença de um fragmento de 381bp (inserção do pUB110). O *locus* H corresponde a junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181, permite identificar a variante estrutural IIIA devido a ausência do fragmento de 303bp neste tipo de elemento.

Tabela 4: Sequência dos *primers* utilizados no PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*.

Locus	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do amplicon (bp)	Especificidade
A	CIF2F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	SCC <i>mec</i> tipo I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDPF1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	SCC <i>mec</i> tipo II
	KDPR1	CGAATGAAGTGAAAGAAAAGTGG		
C	MECIP2	ATCAAGACTTGCATTACAGGC	209	SCC <i>mec</i> tipos II e III
	MECIP3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
D	DCSF2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	SCC <i>mec</i> tipos I, II e IV
	DCSR1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
E	RIF4F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	SCC <i>mec</i> tipo III
	RIF4R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
F	RIF5F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	SCC <i>mec</i> tipo III
	RIF5R13	GTCACAGTAATTCATCAATGC		
G	IS431P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	Diferenciação tipos I e IA
	pUB110R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
H	IS431P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	Diferenciação tipos III e IIIA
	pT181R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
<i>mecA</i>	MECAP4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	162	<i>mecA</i> (controle interno)
	MECAP7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

Para a reação de amplificação foi utilizada uma mistura de reação de 50 µL com o Kit *GeneAmp PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) contendo: tampão de reação II 1X; 200 µM de cada dNTP; 400 nM dos *primers* CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 F13, pUB110 R1 e pT181 R1; 800 nM dos *primers* DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7 e IS431 P4; 200 nM dos *primers* KDP F1, KDP R1, RIF4 F3, RIF4 R9; 1,25 U de *AmpliTa*q DNA polimerase e 5 nM do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany) com os seguintes parâmetros: 4 minutos a

94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 4 minutos a 72°C. Até o momento da eletroforese os tubos foram mantidos a 4°C.

Os produtos da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Seakem LE, FMC BioProducts, Rockland, ME, EUA) em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 X durante 2 horas a 100V. Posteriormente, o DNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob transiluminação ultravioleta. Um marcador de peso molecular de 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi utilizado como padrão de peso molecular.

As cepas COL (SCC*mec* tipo I), PER34 (SCC*mec* tipo IA), N315 (SCC*mec* tipo II), ANS46 (SCC*mec* tipo III), HU25 (SCC*mec* tipo IIIA) e MW2 (SCC*mec* tipo IV) foram utilizadas como controles positivos dos diferentes tipos de SCC*mec*.

#### 4.9. PCR para detecção do complexo gene *ccr*

As cepas MRSA que foram positivas pela reação de multiplex PCR para o SCC*mec* tipo IV ou não tipáveis foram submetidas à detecção do complexo gene *ccr* pela técnica de PCR. As sequências específicas dos *primers* utilizados para a amplificação dos alotipos dos genes *ccr* e diferenciação dos tipos de SCC*mec* foram:

- *ccrAB* alotipo 2 (SCC*mec* tipo IV) (Okuma et al., 2002)

βc: 5' - ATTGCCTTGATAATAGCCITCT - 3'

α2: 5' - TAAAGGCATCAATGCACAAACACT - 3'

- *ccrAB* alotipo 4 (SCC*mec* tipo VI) (Oliveira et al., 2006b)

*ccrAB4* F1: 5' - TCATCAATAAGTATGGAACG - 3'

*ccrAB4* R1: 5' - TTTCTTGCGACTCTCTTGG - 3'

- *ccrC* alotipo 5 (SCC*mec* tipo V) (Milheiriço et al., 2007)

*ccrC* F2: 5' - GTACTCGTTACAATGTTTGG - 3'

*ccrC* R2: 5' - ATAATGGCTTCATGCTTACC - 3'

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo descrito no item 4.5. A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>); 80 µM de cada dNTP (MBI Fermentas, Hanover,

MD); 0,25 µM de cada primer; 1 U de *AmpliTaq* DNA polimerase (Applied Biosystems) e 20 ng do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany) utilizando o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese. Como controles positivos para a amplificação do fragmento de tamanho aproximado de 1 kbp do gene *ccrAB2* foi utilizado o DNA extraído da cepa N315, para a amplificação do fragmento de tamanho aproximado de 12 kbp do gene *ccrAB4* foi utilizado o DNA extraído da cepa HDE288 e para a amplificação do fragmento de tamanho aproximado de 449 bp do gene *ccrC* foi utilizado o DNA extraído da cepa HU388. Em todas as reações utilizou-se água MiliQ esterilizada como controle negativo.

A eletroforese dos amplicons foi realizada em gel de agarose a 0,8% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1 X por 30 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA). O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

#### **4.10. Análise do polimorfismo do DNA cromossômico por Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (PFGE)**

O perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico dos isolados MRSA foi determinado pela técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *SmaI*. Esta técnica foi realizada segundo protocolo estabelecido por Chung e colaboradores (2000).

O isolado teste foi semeado em uma placa de TSA e incubado a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, uma colônia foi inoculada em 5 mL de TSB e incubada a 37°C por 18-24 horas, sob agitação vigorosa. Após esse período, uma alíquota de 500 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo de microcentrífuga e centrifugado a 14.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL da solução tampão Tris-NaCl (Tris 10mM, pH 8,0, NaCl 1M) e novamente centrifugado a 14.000 x g por 2 minutos. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de solução tampão Tris-NaCl e a concentração celular ajustada com a mesma solução tampão pelo cálculo da OD<sub>620nm</sub> ( $Vol_{add} (\mu L) = OD \times 40 \times 210 - 210$ ). Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular ajustada foi

homogeneizada com 100 µL de gel de agarose LPM 1,5% (SeaPlaque *Low Melting Point* agarose, FMC BioProducts, Rockland, ME, EUA) para formação de pequenos blocos de gel (*plugs*) contendo DNA cromossômico.

Os blocos de gel foram incubados a 37°C por um período de 5 horas em solução EC (Tris 6mM, pH 8,0; NaCl 1M; EDTA 0,1M, pH 8,0; desoxicolato de sódio 0,2% e sódio laurylsarcosina 0,5%) acrescida de uma solução de lise composta por RNase (50 µL/mL) (Sigma, St. Louis, Mo, EUA), lisozima (100 µL/mL – Sigma) e lisostafina (50 µL/mL – Sigma). Após esse período, a solução EC-lise foi desprezada e os blocos de gel novamente incubados em solução ES (EDTA 0,5 M, pH 9,0 e sódio laurylsarcosina 1%) com Proteinase K (1 mg/mL) (Roche, Basel, Suíça) por um período mínimo de 17 horas à uma temperatura de 50°C. Após a incubação, os blocos de gel foram lavados ( 5 lavagens com incubações de 30 minutos cada) com a solução tampão Tris-EDTA (Tris 10mM, pH 7,5 e EDTA 1mM, pH 8,0) e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Para cada isolado MRSA, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com 1 µl da enzima *SmaI* (20U/µL) (New England Biolabs, Inc., EUA) em 40 µl do tampão de restrição 1 X e incubado a 25°C por uma noite. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (SeaKem LE, FMC BioProducts, Rockland, ME, EUA), em solução tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 X (Tris 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM) no sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Para a resolução dos fragmentos de restrição foi utilizado corrente alternando com intervalos de pulso de 5 a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 11,3°C por 23 horas. Após, os géis foram corados em solução aquosa contendo 0,5 µL/mL de brometo de etídeo durante 30 minutos, descorados em água destilada por mais 1 hora, fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta e capturados com o sistema Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad). As fotos foram digitalizadas e armazenadas como arquivo TIF para análise posterior. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFGE (New England Biolabs, Ipswich, MA) posicionado na primeira e última coluna de cada gel e 3 cópias da cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325 (número de acesso GenBank CP000253) posicionadas a cada 6 isolados MRSA, em todos os géis de PFGE. Para finalidade de comparação, também foram incluídos nos experimentos, representantes dos clones MRSA internacionais listados na tabela 5.

A análise do perfil dos fragmentos de macrorrestrição resultantes foi inicialmente realizada por inspeção visual segundo os critérios sistematizados por Tenover e colaboradores

(1995): (i) **cepas geneticamente indistinguíveis**, quando as cepas apresentaram perfil de restrição com o mesmo número de bandas e correspondência de tamanho entre elas; (ii) **cepas estritamente relacionadas**, quando as cepas diferiram em duas a três bandas nos perfis de restrição; (iii) **cepas possivelmente relacionadas**, quando as cepas diferiram em 4 a 6 bandas nos perfis de restrição e (iv) **cepas não relacionadas**, quando as cepas diferiram em sete ou mais bandas nos perfis de restrição.

Tabela 5: Clones internacionais de MRSA utilizados para comparação por PFGE com os MRSA isolados das crianças de creche do município de Goiânia.

Referência	Clone	SCCmec	MLST	spa type
HU25	Clone Epidêmico Brasileiro	IIIA	ST239	t138
BK2464	Clone Nova Iorque/Japão	II	ST5	t002
HDE288	Clone Pediátrico	IV	ST5	t214
HAR38	Clone Berlim	V	ST45	t004
HAR24	EMRSA-15	IV	ST22	t022
HPV107	Clone Ibérico	IA	ST247	t051

Adicionalmente, os géis de PFGE foram utilizados como imagens preto e branco invertidas de 8 bits e processados pelo programa BioNumerics (versão 5.0; *Applied Maths, Ghent, Belgium*). O processo de normalização intra e inter géis foi padronizado com a cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325, que após digestão com a enzima de restrição *SmaI* produz bandas visíveis entre 674 kb e 9 kb. Todas as bandas dos isolados MRSA situadas acima da maior banda (674 kb) e abaixo da menor banda (9 kb) da NCTC 8325 foram excluídas da análise. A construção do dendrograma, para avaliar a relação genética entre as cepas foi realizada utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945), baseado na posição e presença das bandas e no algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair-Groups Method*) através de agrupamentos por médias não ponderadas (Sneath and Sokal, 1973). Os parâmetros de otimização e tolerância foram utilizados com os respectivos valores, 0,7 e 1,0%. Cada *cluster* de isolados foi definido como um grupamento de perfis ( $n \geq 2$ ) apresentando um coeficiente de similaridade acima de 80% (Carriço et al., 2005).



#### 4.11. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Todas as cepas MRSA foram caracterizadas pela técnica de MLST conforme protocolo desenvolvido por Enright e colaboradores (2000). O método baseia-se no sequenciamento dos fragmentos internos (~450bp) de regiões altamente conservadas de sete genes conservadores (*housekeeping*) específicos para a espécie *Staphylococcus* sp. Os pares de *primers* utilizados para os sete genes foram descritos a seguir:

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')
Carbamato quinase ( <i>arcC</i> )	<i>arc-F</i>	CCTTTATTTGATTCACCAGCG
	<i>arc-R</i>	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimato desidrogenase ( <i>aroE</i> )	<i>aro-F</i>	ATCGGAAATCCTATTTTCACATTC
	<i>aro-R</i>	GGTGTTGTATTAATAACGATATC
Glicerol quinase ( <i>glpF</i> )	<i>glp-F</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	<i>glp-R</i>	TGGTAAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanilato quinase ( <i>gmk</i> )	<i>gmk-F</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	<i>gmk-R</i>	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA
Fosfato acetiltransferase ( <i>pta</i> )	<i>pta-F</i>	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
	<i>pta-R</i>	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA
Triosefosfato isomerase ( <i>tpi</i> )	<i>tpi-F</i>	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA
	<i>tpi-R</i>	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetil coenzima A acetiltransferase ( <i>yqiL</i> )	<i>yqi-F</i>	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC
	<i>yqi-R</i>	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC

Para a extração do DNA genômico das cepas MRSA foi utilizado o protocolo descrito no item 4.5. A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>); 80 µM de cada dNTP (MBI Fermentas, Hanover, MD); 0,25 µM de cada primer; 1 U de *AmpliTaq* DNA polimerase (Applied Biosystems) e 20 ng do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany) seguindo o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1 X por 30 minutos a 120V. O marcador de 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi utilizado como padrão de peso molecular. O gel foi corado com brometo de etideo a 0,5 µg/mL visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Após a eletroforese, os produtos de PCR positivos para cada gene foram purificados com o kit *High Pure PCR Product Purificant* (Roche, Basel, Suíça). O sequenciamento dos produtos purificados com os pares de *primers* (2 pmol/µL) utilizados na amplificação inicial de cada gene foi realizado pela empresa Macrogen, Korea (<http://dna.macrogen.com>). As sequências de DNA obtidas foram analisadas com o auxílio do software DNAStar (Lasergene, Madison, Wis.). As sequências consensos resultantes foram submetidas ao servidor MLST (<http://www.mlst.net>) que para cada locus atribuiu um número de alelo distinto. Um perfil alélico foi gerado com os alelos de cada um dos sete genes e o *sequence type* (ST) determinado.

#### 4.12. *spa* typing

A região polimórfica X - região de pequenas sequências de repetição de número variável – no final da porção 3' do gene da proteína A (*spa*) foi determinada para as cepas MRSA de acordo com os protocolos previamente estabelecidos (Harmsen et al., 2003; Koreen et al., 2004). Para a amplificação da região X foram utilizados os *primers*:

Spa 113F: 5' - TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC – 3'

Spa 1514R: 5' - CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT – 3'

A extração do DNA genômico foi realizada como descrito no item 4.5. A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>); 80 µM de cada dNTP (MBI Fermentas, Hanover, MD); 0,25 µM de cada primer; 1 U de Ampli*Taq* DNA polimerase (Applied Biosystems) e 20 ng do DNA *template*. O termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany) foi programado com os parâmetros 5 minutos a 80°C, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 90 segundos

a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C para a reação de amplificação. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C, até o momento da eletroforese

Como controle positivo da reação de amplificação foi utilizado o DNA extraído da cepa SAMS 991, como controle negativo água MiliQ esterilizada e como padrão de peso molecular o marcador 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os *amplicons* resultantes foram resolvidos com eletroforese em gel de agarose a 0,8% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1 X por 1 hora a 90V. O gel foi corado em solução aquosa de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Os produtos de PCR que amplificaram a região X foram purificados com o kit *High Pure PCR Product Purificant* (Roche, Basel, Suíça) e enviados com os respectivos *primers* para a MacroGen para sequenciamento. A análise das sequências obtidas foi realizada com o software Ridom Staphtype (versão 1.5.13, Ridom, Alemanha). Os *repeats* que compõem a região polimórfica X e que definem um *spa type* podem apresentar 21, 24 ou 27 bp. Cada *repeat* difere um do outro por pelo menos um evento de mutação pontual. Baseado no valor qualitativo de cada base no eletroferograma da sequência, o software constrói uma sequência consenso resultante de ambas as direções, detecta automaticamente os *spa repeats* e atribui um *spa type* (numérico).

#### **4.13. PCR para detecção do gene *lukS-F*, codificador da Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)**

Todas as cepas de MRSA foram investigadas para a detecção do marcador de virulência PVL. Os *primers* utilizados para a amplificação do gene *lukS-F* foram sintetizados a partir de sequências de DNA genômico depositadas no banco de dados GenBank (número de acesso GenBank AB006796) (Lina et al., 1999). As sequências dos *primers* utilizados foram:

PVL1: 5' - ATCATTAGGTA AAAATGTCTGGACATGATCCA- 3'

PVL2: 5'- GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC – 3'

O método de extração do DNA genômico foi descrito no item 4.5. A mistura de reação foi preparada em um volume final de 50 µL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>); 80 µM de cada dNTP (MBI Fermentas, Hanover, MD); 0,25

$\mu\text{M}$  de cada primer; 1 U de *AmpliTaq* DNA polimerase (Applied Biosystems) e 20  $\eta\text{g}$  do DNA *template*. Para a reação de amplificação utilizou-se o programa: 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 25 ciclos de 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $55^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$  e uma extensão adicional de 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  no termociclador T1 (Biometra Goettingen, Germany). Os tubos de PCR foram mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento da eletroforese. O DNA da cepa MW2 foi utilizado como controle positivo, água MiliQ esterilizada como controle negativo e marcador de 1kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) como padrão de peso molecular. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% (Seakem LE, FMC) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1 X por 1 hora a 120V. À coloração com brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), os géis foram visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta.

#### **4.14. Análise de dados**

A base de dados foi construída com o programa EpiInfo Windows 3.2 e os possíveis fatores de risco foram analisados utilizando o software SPSS v.15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A idade foi estratificada em grupos de  $\leq 23$  meses e  $> 23$  meses. Isolados com resistência a pelo menos duas classes de antimicrobianos em adição aos  $\beta$ -lactâmicos foram definidos como MRSA multirresistentes. Para a comparação das medianas da idade foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Regressão logística foi usada para analisar os fatores de risco associados ao portador de *S. aureus*. Os resultados foram apresentados como *odds ratio* (OR) com intervalo de 95% de confiança (IC 95%). Todas as variáveis com valor de p menor que 0,05 na análise univariada foram incluídas no modelo multivariável para identificar fatores independentemente associados ao portador de *S. aureus*. O nível de probabilidade de 0,05 (bi-caudal) foi utilizado para determinar a significância estatística.

## 5. Conclusões

- A população pediátrica estudada apresentou taxa de colonização nasal de 31,1% e 1,2% para *S. aureus* e MRSA, respectivamente;
- Os fatores significativamente associados com colonização nasal de *S. aureus* em crianças de creches do município foram idade acima de 2 anos e ter frequentado outra creche;
- Alto grau de escolaridade da mãe foi fator protetor para colonização nasal com *S. aureus*;
- Detectou-se uma linhagem genotípica predominante (ST239-MRSA-III A) entre os MRSA isolados a qual compartilha mais de 80% de similaridade genética com o clone epidêmico brasileiro;
- SCCmec tipo V foi detectado em um isolado MRSA, sendo esta a primeira descrição no Brasil.

## 6. Referências Bibliográficas

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

Aires de Sousa M, Crisóstomo MI, Sanches IS, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, de Lencastre H 2003a. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *J Clin Microbiol* 41:159-163.

Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisóstomo MI, de Lencastre H 2003b. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol* 41:2027-2032.

Aires de Sousa M, Conceição T, Simas C, de Lencastre H 2005. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol* 43:5150-5157.

Aires de Sousa, M., C. E. Parente, O. Vieira-da-Motta, I. C. Bonna, D. A. Silva, and H. de Lencastre. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3845-3849.

Aires de Sousa M, Correia B, de Lencastre H; Multilaboratory Project Collaborators 2008. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol* 46:2912-2917.

Alfaro C, Mascher-Denen M, Fergie J, Purcell K 2006. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients admitted to Driscoll Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 25:459-461.

Bell JM, Turnidge JD: SENTRY APAC 2002. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 46:879-881.

Beretta AL, Trabasso P, Stucchi RB, Moretti ML 2004. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital from 1991 to 2001. *Braz J Med Biol Res* 37:1345-1351.

Bernardo MF, Ueno M 2008. Incidence of *Staphylococcus aureus* colonization in children attending day-care centers. *Rev Panam Infectol* 10:20-23.

Berger-Bächi B, Rohrer S 2002. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 178:165-171.

Bischoff WE, Wallis ML, Tucker KB, Reboussin BA, Sherertz RJ 2004. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: prevalence, clonal relationships, and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:485-491.

Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, Verbrugh HA, Hermans PW 2004. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 5:1871-1872.

Boyce JM 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology and preventive measures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13:725-737.

Boyce JM 1998. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? *JAMA* 279:623-624.

Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS 2005. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC *mec*) type V<sub>T</sub> or SCC *mec* type VI. *J Clin Microbiol* 43:4719-4730.

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

Brady MT 2005. Infectious disease in pediatric out-of-home child care. *Am J Infect Control* 33:276-285.

Branchini ML, Morthland VH, Tresoldi AT, Von Nowakonsky A, Dias MB, Pfaller MA 1993. Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis* 17:275-281.

Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW; Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemothe* 56:1000-1018.

Buescher ES 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatrics. *Curr Opin Pediatr* 17:67-70.

Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H, Almeida JS 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 43:5483-5490.



Centers for Disease Control and Prevention 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48:707-710.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:565-567.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2003a. Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections-Los Angeles County, California, 2002-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52:88.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2003b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among competitive sports participants-Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles County, 2000-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52:793-795.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2003c. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in correctional facilities-Georgia, California, and Texas, 2001-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52:992-996.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)a. MRSA in Healthcare Settings. Disponível em: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_MRSA\\_spotlight\\_2006.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_MRSA_spotlight_2006.html).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)b. Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Disponível em: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_mrsa\\_ca.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca.html).

Cespedes C, Miller M, Quagliarello B, Vavagiakis P, Klein RS, Lowy FD 2002. Differences between *Staphylococcus aureus* isolates from medical and nonmedical hospital personnel. *J Clin Microbiol* 40:2594-2597.

Cespedes C, Said-Salim B, Miller M, Lo SH, Kreiswirth BN, Gordon RJ, Vavagiakis P, Klein RS, Lowy FD 2005. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J Infect Dis* 191:444-452.

Chambers HF 1997. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781-791.

Chambers HF 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emer Infect Dis* 7: 178-182.

Charlebois ED, Bangsberg DR, Moss NJ, Moore MR, Moss AR, Chambers HF, Perdreau-Remington F 2002. Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin Infect Dis* 34:425-433.

Chen CJ, Huang YC 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 38:376-382.

Chen CJ, Su LH, Chiu CH, Lin TY, Wong KS, Chen YY, Huang YC 2007. Clinical features and molecular characteristics of invasive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwanese children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59:287-293.

Cheng Immergluck L, Kanungo S, Schwartz A, McIntyre A, Schreckenberger PC, Diaz PS 2004. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization in healthy children in the United States. *Epidemiol Infect* 132: 159-166.

Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Leavit A, Somekh E, Regev-Yochai G, Chowers M, Shitrit P, Carmeli Y 2008. SCC $mec$  and *spa* types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Israel. Detection of SCC $mec$  type V. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:385-390.

Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH, Hiramatsu K 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC $mec$ )

typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC<sub>mec</sub> elements. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1001-1012.

Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P; Multilaboratory Project Collaborators 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 6:189-198.

Chung M, Dickinson G, de Lencastre H, Tomasz A 2004. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol* 42:542-547.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cohen ML 1986. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* 108:796-799.

Cole AM, Tahk S, Orien A, Yoshioka D, Kim YH, Park A, Ganz T 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Labor Immunol* 8:1064-1069.

Conceição T, Aires-de-Sousa M, Füzi M, Tóth A, Pászti J, Ungvári E, van Leeuwen WB, van Belkum A, Grundmann H, de Lencastre H 2007. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. *Clin Microbiol Infect* 13:971-979.

Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, Murray RJ, Grubb WB, Christiansen KJ 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 12:241-247.

Cordell RL, Waterman S, Chang A, Saruwatari M, Brown M, Solomon SL 1999. Provider-reported illness and absence due to illness among children attending child-care homes and centers in San Diego, Calif. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153:275-280.

Cordell RL, MacDonald JK, Solomon SL, Jackson LA, Boase J 1997. Illnesses and absence due to illness among children attending child care facilities in Seattle-King County, Washington. *Pediatrics* 100:850-855.

Cosgrove SE 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis* 15:S82-89.

Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y 2005. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26:166-174.

Creech CB, Kernodle DS, Alsentzer A, Wilson C, Edwards KM 2005. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 24:617-621.

Creech CB, Talbot TR, Schaffner W 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the way to the wound is through the nose. *J Infect Dis* 15:169-71.

Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R, Vindel A; Spanish Group for the Study of *Staphylococcus* 2007. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect* 13:250-256.

Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, Boyle-Vavra S 2002. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* 186:1344-1347.

Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis* 15:776-782.

Davis SL, Perri MB, Donabedian SM, Manierski C, Singh A, Vager D, Haque NZ, Speirs K, Muder RR, Robinson-Dunn B, Hayden MK, Zervos MJ 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Microbiol* 45:1705-1711.

de Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A 1997. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect* 3:289-296.

de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol* 10:428-435.

de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, Vidal CF, Figueiredo AM 2007. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect* 13:1165-72.

Deurenberg RH, Vink C, Oudhuis GJ, Mooij JE, Driessen C, Coppens G, Craeghs J, De Brauwer E, Lemmen S, Wagenvoort H, Friedrich AW, Scheres J, Stobberingh EE 2005. Different clonal complexes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine region. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4263-4271.

Deurenberg RH, Stobberingh EE 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 8:747-763.

Dice LR, 1945. Measures of the amount of ecological association between species. pp. 297-302.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M 2001. Survey of infectious due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32:114S-132S.

Diep BA, Otto M 2008. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol* 16:361-369.

Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattévin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Kreiswirth BN, Otto M, DeLeo FR, Chambers HF 2008. Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS ONE* 12:e3198.

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

Ehlert K, Schroder W, Labischinski H 1997. Specificities of FemA and FemB for Different Glycine Residues: FemB Cannot Substitute for FemA in Staphylococcal Peptidoglycan Pentaglycine Side Chain Formation. *J Bacteriol* 179:7573–7576.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38:1008-1015.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 28:7687-7692.

Enright MC 2003. The evolution of a resistant pathogen—the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 3:474-479.

Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 46:136-144.

Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH 2008. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 32:23-37.

Gerogianni I, Mpatavanis G, Gourgoulis K, Maniatis A, Spiliopoulou I, Petinaki E 2006. Combination of staphylococcal chromosome cassette SCC<sub>mec</sub> type V and Panton-Valentine leukocidin genes in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that caused necrotizing pneumonia in Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56:213-216.

Ghuysen JM 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol* 2:372-380.

Gomes AR, Westh H, de Lencastre H 2006. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3237-3244.

Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ 2008. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis* 197:1226-1234.

Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, Moore KA, Cheek JE 2001. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA* 286:1201-1205.

Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368:874-885.

Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CM, Primo MG 2006. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J Hosp Infect* 63:330-336.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU 2006. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46:8-20.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 41:5442-5448.

Hartman BJ, Tomasz A 1986. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158:513-516.

Heininger U, Datta F, Gervaix A, Schaad UB, Berger C, Vaudaux B, Aebi C, Hitzler M, Kind C, Gnehm HE, Frei R; PIGS/MRSA Study Group 2007. Prevalence of nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children a multicenter cross-sectional study. *Pediatr Infect Dis J* 26:544-546.

Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bachi B 1993. Influence of *femB* on Methicillin Resistance and Peptidoglycan Metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 175:1612-1620.



Herold BC, Cheng Immergluck L, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch C, Daum RS 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 279:593-598.

Herwaldt LA, Boyken LD, Coffman S, Hochstetler L, Flanigan MJ 2003. Sources of *Staphylococcus aureus* for patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 23:237-241.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemothe* 40:135-136.

Hiramatsu K, Cui I, Kuroda M, Ito T 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9:486-493.

Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T 2002. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 292:67-74.

Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, Baba T 2004. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 6:S5-S8.

Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K 2005. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol* 43:3364-3372.

Ho PL, Chuang SK, Choi YF, Lee RA, Lit AC, Ng TK, Que TL, Shek KC, Tong HK, Tse CW, Tung WK, Yung RW; Hong Kong CA-MRSA surveillance network 2008a. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:245-250.

Ho PL, Lai EL, Chow KH, Chow LS, Yuen KY, Yung RW 2008b. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in residential care homes for the elderly in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:135-142.

Ho PL, Cheung C, Mak GC, Tse CW, Ng TK, Cheung CH, Que TL, Lam R, Lai RW, Yung RW, Yuen KY 2007a. Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:145-151.

Ho PL, Wang TK, Ching P, Mak GC, Lai E, Yam WC, Seto WH 2007b. Epidemiology and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in residential care homes for elderly persons in Hong Kong. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:671-678.

Holmes SJ, Morrow AL, Pickering LK 1996. Child-care practices: effects of social change on the epidemiology of infectious diseases and antibiotic resistance. *Epidemiol Rev* 18:10-28.

Huang YC, Su LH, Chen CJ, Lin TY 2005. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in school children without identifiable risk factors in northern Taiwan. *Pediatr Infect Dis J* 24:276-278.

Huang YH, Tseng SP, Hu JM, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ 2007a. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. *Clin Microbiol Infect* 13:717-724.

Huang YC, Ho CF, Chen CJ, Su LH, Lin TY 2007b. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in household contacts of children with community-acquired diseases in Taiwan. *Pediatr Infect Dis J* 26:1066-1068.

Huang YC, Hwang KP, Chen PY, Chen CJ, Lin TY 2007c. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among Taiwanese children in 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 45:3992-3995.

Huang YC, Ho CF, Chen CJ, Su LH, Lin TY 2008. Comparative molecular analysis of community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in northern Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 14:1167-1172.

Hübscher J, Jansen A, Kotte O, Schäfer J, Majcherczyk PA, Harris LG, Bierbaum G, Heinemann M, Berger-Bächi B 2007. Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 8:307.

Huijsdens XW, van Santen-Verheувel MG, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Eijkelkamp BA, de Neeling AJ, Wannet WJ 2006. Multiple cases of familial transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 44:2994-2996.

Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS 2000. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at tertiary care pediatric facility. *Pediatric Infect Dis J* 19:1163-1166.

Hussain FM, Boyle-Vavra S, Daum RS 2001. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic. *Pediatr Infect Dis J* 20:763-7.

Huskins WC 2000. Transmission and control of infections in out-of home child care. *Pediatr Infect Dis J* 19:S106-S110.

IBGE 2002. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Base de informações por setor censitário. Censo 2000 – Resultados do Universo, Goiás – Goiânia [CD-ROOM]. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002.

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

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

Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 6:41-52.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2637-2651.

Jevons MP 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. *British Med J* 1:124-125.

Jonas D, Grundmann H, Hartung D, Daschner FD, Towner KJ 1999. Evaluation of the *mecA femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:643-647.

Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H 2002. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. *J Clin Microbiol* 40:1821-1823.

Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA 2008. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCC*mec* types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 14:203-210.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1549-1555.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K 2001. 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*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1955-1963.

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

Kerttula AM, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J, Ibrahim S, Agthe N, Broas M, Jägerroos H, Virolainen A 2005. Molecular epidemiology of an outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a health care ward and associated nursing home. *J Clin Microbiol* 43:6161-6163.

Kerttula AM, Lyytikäinen O, Kardén-Lilja M, Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, Vuopio-Varkila J 2007. Nationwide trends in molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland, 1997-2004. *BMC Infect Dis* 14:94.

Kilic A, Guclu AU, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu AC 2008. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:607-614.

Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH, Park WB, Kim SH, Bang JH, Kim DM, Park KU, Shin S, Lee MS, Choi HJ, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Kim HB, Choe KW 2008. A survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 60:1108-1114.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin

SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators 2007a. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 298:1763-71.

Klevens RM, Morrison MA, Fridkin SK, Reingold A, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Fosheim G, McDougal LK, Tenover FC; Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network 2007b. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis* 12:1991-3.

Kloos WE 1997. Taxonomy and systematic of staphylococci indigenous to humans. In: The staphylococci in human disease. New York, Churchill Livingstone p. 113-138.

Kluytmans J, Belkum A, Verbrugh H 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10:505-520.

Kluytmans JA, Wertheim HF 2005. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 33:3-8.

Kluytmans J, Struelens M 2009. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ* 338:b364.

Ko KS, Lee JY, Baek JY, Peck KR, Rhee JY, Kwon KT, Heo ST, Ahn KM, Song JH 2008. Characterization of *Staphylococcus aureus* nasal carriage from children attending an outpatient clinic in Seoul, Korea. *Microb Drug Resist* 14:37-44.

Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A, Kurokawa I 1994. Detection of *mecA*, *femA* and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol and Infect* 113:259-266.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment:

rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 51:264-274.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Procop G, Schreckenberger PC, Woods 2006. Gram-positive cocci: part I: Staphylococci and related gram-positive cocci. In: Koneman's color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth edition. Lippincott Williams e Wilkins. P 623-671.

Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN 2004. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 42:792-799.

Lamaro-Cardoso J, Castanheira M, de Oliveira RM, e Silva SA, Pignatari AC, Mendes RE, Pimenta FC, Andrade AL 2007. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:467-470.

Lebon A, Labout JA, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, van Wamel W, Moll HA, van Belkum A 2008. Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study. *J Clin Microbiol* 46:3517-3521.

Leclercq R 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 15:482-492.

Liao RS, Storch GA, Buller RS, Orscheln RC, Mardis ER, Armstrong JR, Dunne WM Jr 2006. Blinded comparison of repetitive-sequence PCR and multilocus sequence typing for genotyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a children's hospital in St. Louis, Missouri. *J Clin Microbiol* 44:2254-2257.

Lim D, Strynadka NC 2002. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* 9:870-876.

Lim TT, Chong FN, O'Brien FG, Grubb WB 2003. Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their *mec* regions. *Pathology* 35:336-343.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29:1128-1132.

Lindsay JA, Holden MT 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics* 6:186-201.

Lo WT, Lin WJ, Tseng MH, Wang SR, Chu ML, Wang CC 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 12:1267-1270.

Lo WT, Lin WJ, Tseng MH, Lu JJ, Lee SY, Chu ML, Wang CC 2007. Nasal carriage of a single clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among kindergarten attendees in northern Taiwan. *BMC Infect Dis* 1:51.

Lo WT, Lin WJ, Tseng MH, Wang SR, Chu ML, Wang CC 2008. Risk factors and molecular analysis of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 27:713-718.

Lowy FD 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Eng J Med* 339:520-532.

Lowy FD 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111:1265-1273.

Lu N, Samuels ME, Shi L, Baker SL, Glover SH, Sanders JM 2004. Child day care risks of common infectious diseases revisited. *Child Care Health Dev* 30:361-368.



Lu PL, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L, Siu LK 2005. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *J Clin Microbiol* 43:132-139.

Luczak-Kadłubowska A, Sulikowska A, Empel J, Piasecka A, Orczykowska M, Kozinska A, Hryniewicz W 2008. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. *J Clin Microbiol* 46:2930-2937.

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

Mainous AG, Hueston WJ, Everett CJ, Diaz VA 2006. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. *Ann Fam Med* 4:132-137.

Maltezou HC, Giamarellou H 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents* 27:87-96.

Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG 2007. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. *Emerg Infect Dis* 13:2362-42.

Marques AR, Petrillo V, Hoefel H 1989. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a general hospital in Brazil. *J Hosp Infect.* 14:380-381.

Masuda K, Masuda R, Nishi J, Tokuda K, Yoshinaga M, Miyata K 2002. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. *Pediatr Int* 44:376-380.

McDonald M, Dougall A, Holt D, Huygens F, Oppedisano F, Giffard PM, Inman-Bamber J, Stephens AJ, Towers R, Carapetis JR, Currie BJ 2006. Use of a single-nucleotide polymorphism

genotyping system to demonstrate the unique epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in remote aboriginal communities. *J Clin Microbiol* 44:3720-3727.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 41:5113-5120.

Melo MC, Silva-Carvalho MC, Ferreira RL, Coelho LR, Souza RR, Gobbi CN, Rozenbaum R, Solari CA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM 2004. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *J Hosp Infect* 58:276-285.

Melter O, Aires de Sousa M, Urbásková P, Jakubů V, Zemlicková H, de Lencastre H 2003. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 41:4998-5005.

Milheiro C, Oliveira DC, de Lencastre H 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3374-3377.

Ministério da Saúde do Brasil. Datasus 2005. Secretaria Executiva. Informações em Saúde. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/popgo.def>.

Mishaan AM, Mason EO Jr, Martinez-Aguilar G, Hammerman W, Propst JJ, Lupski JR, Stankiewicz P, Kaplan SL, Hulten K 2005. Emergence of a predominant clone of community-acquired *Staphylococcus aureus* among children in Houston, Texas. *Pediatr Infect Dis J* 24:201-206.

Monecke S, Slickers P, Ellington MJ, Kearns AM, Ehricht R 2007. High diversity of Pantone-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and

implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clin Microbiol Infect* 13:1157-1164.

Moroney SM, Heller LC, Arbuckle J, Talavera M, Widen RH 2007. Staphylococcal cassette chromosome *mec* and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Clin Microbiol* 45:1019-1021.

Munckhof WJ, Nimmo GR, Carney J, Schooneveldt JM, Huygens F, Inman-Bamber J, Tong E, Morton A, Giffard P 2008. Methicillin-susceptible, non-multiresistant methicillin-resistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a clinical, epidemiological and microbiological comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:355-3564.

Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 10:2976-2984.

Nakamura MM, Rohling KL, Shashaty M, Lu H, Tang YW, Edwards KM 2002. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population. *Pediatr Infect Dis* 21:917-922.

Nguyen DM, Mascola L, Brancourt E 2005. Recurring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a football team. *Emerg Infect Dis* 11:526-532.

Nimmo GR, Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, Christiansen KJ, Turnidge JD, Gosbell IB, Collignon P, McLaws ML 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med J Aust* 17:384-388.

Nimmo GR, Coombs GW 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents* 31:401-410.

Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MF, Boelens HA, Hofman A, van Belkum A, Verbrugh HA 2004. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a "culture rule". *Clin Infect Dis* 39:806-811.

Nouwen JL, Fieren MW, Snijders S, Verbrugh HA, van Belkum A 2005. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney Int* 67:1084-1092.

O'Brien FG, Lim TT, Chong FN, Coombs GW, Enright MC, Robinson DA, Monk A, Saïd-Salim B, Kreiswirth BN, Grubb WB 2004. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol* 42:3185-3190.

O'Brien FG, Coombs GW, Pearson JC, Christiansen KJ, Grubb WB 2005. Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 49:5129-5132.

Ogston A 1881. Report upon micro-organisms in surgical diseases. *BMJ* 1:369-375.

Oguzkaya-Artan M, Baykan Z, Artan C 2008. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. *Jpn J Infect Dis* 61:70-72.

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 40:4289-4294.

Oliveira, DC, Tomasz A., de Lencastre H 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist* 7:349-361.

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

Oliveira DC, de Lencastre H 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2155-2161.

Oliveira DC, Milheiriço C, de Lencastre H 2006a. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3457-3459.

Oliveira DC, Milheiriço C, Vinga S, de Lencastre H 2006b. Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Antimicrob Chemother* 58:23-30.

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

Pan ES, Diep BA, Carleton HA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Haller BL, Perdreau-Remington F 2003. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in California jails. *Clin Infect Dis* 15:1384-1388.

Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 9:605-610.

Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, de Silva GD, Kantzanou MN, Crook D, Silleman K, Day NPJ 2003. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J Clin Microbiol* 41:5718-5725.

Perez LR, D'Azevedo PA 2008. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50:135-137.

Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B 2008. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis* 15:787-794.

Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, Rahav G, Rubinstein E 2004. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in children. *JAMA* 292:716-720.

Reinert C, McCulloch JA, Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K, Mamizuka EM 2008. Type IV SCCmec found in decade old Brazilian MRSA isolates. *Braz J Infect Dis* 12:213-216.

Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol* 43:1985-1988.

Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, Del Peloso PF, da Costa Ferreira Leite C, Teixeira LA, Figueiredo AM 2007. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59:339-345.

Roberts RB, de Lencastre H, Eisner W, Severina EP, Shopsin B, Kreiswirth BN, Tomasz A 1998. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group. *J Infect Dis* 178:164-171.

Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC 2007. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

(MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol* 45:2554-2563.

Rozenbaum R, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Melo MC, Gobbi CN, Coelho LR, Ferreira RL, Ferreira-Carvalho BT, Schuenck AL, Neves FM, Silva LR, Figueiredo AM 2006. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disseminated in a home care system. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:1041-1050.

Sá-Leão R, Sanches IS, Couto I, Alves CR, de Lencastre H 2001. Low prevalence of methicillin-resistant strains among *Staphylococcus aureus* colonizing young and healthy members of the community in Portugal. *Microb Drug Resist* 7:237-245.

Sá-Leão R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H 2003. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol* 37:1913-1920.

Sader HS 1999. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in the three Brazilian Medical Center . *Braz J Infect Dis* 3:63-79.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America) 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 8:25-79.

Safdar N, Bradley EA 2006. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am J Med* 121:310-315.

Salgado CD, Farr BM, Calfee DP 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 15:131-139.

Sanches IS, Aires de Sousa M, Sobral L, Calheiros I, Felicio L, Pedra I, de Lencastre H 1995. Multidrug-resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal. *Microb Drug Resist* 1:299-306.

Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E 1982. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. *Ann Intern Med* 96:11-16.

Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Stamatakis E, Vris A, Christodoulidi I, Protopapadakis G, Spiliopoulou I 2008. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect* 14:995-1001.

Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM 2006. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis* 1:647-656.

Shahin R, Johnson IL, Jamieson F, McGeer A, Tolkin J, Ford-Jones EL 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a child care center following a case of disease. Toronto Child Care Center Study Group. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153:864-868.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37:3556-3563.

Shopsin B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo ML, Fierman A, Krasinski K, Kornblum J, Alcibes P, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN 2000. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *J Infect Dis* 182:359-362.



Shopsin B, Herring S, Kreiswirth BN 2003. Hospital-acquired and community-derived: the future of MRSA? *Clin Infect Dis* 1:151-152.

Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC 2005. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemoter* 49:2070-2083.

Sivaraman K, Venkataraman N, Tsai J, Dewell S, Cole AM 2008. Genome sequencing and analysis reveals possible determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *BMC Genomics* 22:433.

Sneath PHA and Sokal RR 1973. Numerical taxonomy. pp. 573.

Soares MJ, Teixeira LA, Nunes MR, da Silva Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM 2001. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. *J Med Microbiol* 50:732-742.

Stapleton PD, Taylor PW 2002. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* 85:57-72.

Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nübel U, Witte W 2008. *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol* 46:574-581.

Suggs AH, Maranan MC, Boyle-Vavra S, Daum RS 1999. Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant asymptomatic *Staphylococcus aureus* colonization in children without identifiable risk factors. *Pediatr Infect Dis J* 18:410-414.

Tacconelli E, Venkataraman L, De Girolami PC, D'Agata EMC 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia diagnosed at hospital admission: distinguishing between community-acquired versus healthcare-associated strains. *J Antim Chem* 53:474-479.

Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R 2008. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 61:26-38.

Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, Isobe H, Dohmae S, Ozaki K, Takano M, Iwao Y, Shibuya M, Okubo T, Yabe S, Shi D, Reva I, Teng LJ, Yamamoto T 2008. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 52:837-45.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239.

Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, Dunman PM 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 44:108-118.

Tenover FC, McAllister S, Fosheim G, McDougal LK, Carey RB, Limbago B, Lonsway D, Patel JB, Kuehnert MJ, Gorwitz R 2008. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* 46:2837-2841.

Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AMS, de Lencastre H, Tomasz A 1995. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol* 33:2400-04.

Thornsberry C 1988. The development of antimicrobial resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 21:9-17.

Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 10:1627-1634.

Toraño G, Quiñones D, Hernández I, Hernández T, Tamargo I, Borroto S 2001. Nasal carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among cuban children attending day-care centers. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19:367-370.

Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM 2003. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis* 7:32-43.

Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS 2005. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43:3435-3437.

Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Etienne J 2007. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 65:105-109.

Udo EE, Pearman JW, Grubb WB 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 25:97-108.

Valentini P, Parisi G, Monaco M, Crea F, Spanu T, Ranno O, Tronci M, Pantosti A 2008. An uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report. *Ann. Clin Microbiol Antimicrob* 30:11.

van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrugh HÁ 2009. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 9:32-47.

VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37:3133-3140.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9:978-984.

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

Vivoni AM, Diep BA, de Gouveia Magalhães AC, Santos KR, Riley LW, Sensabaugh GF, Moreira BM 2006. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol* 44:1686-1691.

Vlack S, Cox L, Peleg AY, Canuto C, Stewart C, Conlon A, Stephens A, Giffard P, Huygens F, Mollinger A, Vohra R, McCarthy JS 2006. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Queensland Indigenous community. *Med J Aus* 5:556-559.

von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344:11-16.

Wagenvoort JH, De Brauwier EI, Sijstermans ML, Toenbreker HM 2005. Risk of re-introduction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital by intrafamilial spread from and to healthcare workers. *J Hosp Infect* 59:67-68.

Wang CC, Lo WT, Chu ML, Siu LK 2004. Epidemiological typing of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in Taiwan. *Clin Infect Dis* 15:481-487.

Wang JL, Wang JT, Chen SY, Hsueh PR, Kung HC, Chen YC, Chang SC 2007. Adult methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in Taiwan: clinical significance of non-multi-resistant antibiogram and Panton-Valentine leukocidin gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59:365-371.

Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 27:703-705.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751-762.

Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 13:255-258.

Zemlicková H, Urbásková P, Adámková V, Motlová J, Lebedová V, Procházka B 2006. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Staphylococcus aureus* isolated from the nasopharynx of healthy children attending day-care centres in the Czech Republic. *Epidemiol Infect* 134:1179-1187.

# **ANEXOS**

**1º Artigo**

**First report of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Type V in the  
American continent.**

Artigo submetido à revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

**First report of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Type V in the American continent.**

Juliana Lamaro-Cardoso<sup>1</sup>, Andre Kipnis<sup>1</sup>, Marta Aires de Sousa<sup>2</sup>, Hermínia de Lencastre<sup>2</sup>, Ana Lucia S. Sgambatti Andrade<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

<sup>2</sup> The Rockefeller University, New York, NY10021, USA; Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Oeiras, Portugal

\* Address for correspondence: Ana Lúcia S. S. Andrade, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, Esq. 1º Avenida, S. Leste Universitário, CEP: 74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone: (55) 62 32027942, Fax: (55) 62 32029051. E-mail: [ana@iptsp.ufg.br](mailto:ana@iptsp.ufg.br)



Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most serious pathogens in both healthcare and community environments (6). Methicillin resistance is conferred by the presence of the *mecA* gene carried on an exogenous mobile genetic element named staphylococcal chromosomal cassette (*SCCmec*). *SCCmec* types I, II, III and VI have been mostly linked to healthcare-associated MRSA strains (HA-MRSA) while types IV and V have been commonly connected with community-associated (CA-MRSA) isolates (12). Since the first *SCCmec* type V strain was described in Australia (9, 13) several cases have been reported in the European and Asian continents.

In this report we describe the first detection of a *SCCmec* type V-MRSA strain in the American continent recovered during a major MRSA surveillance study among healthy children attending day-care centers in Goiânia, Brazil. The isolate was obtained in September 2005 from a nasal specimen of a healthy male infant aged thirty-two months. The mother reported that the child had been hospitalized with pneumonia within the previous three months. On that occasion, he received a 4-day course treatment with parenteral sulphamethoxazole/trimethoprim. He was discharged in good health and amoxicillin was prescribed for seven days.

Identification of *S. aureus* was done by standard methods including catalase, coagulase and DNase tests and PCR amplification of *femB*. Susceptibility testing was determined by disk diffusion and Etest<sup>®</sup> according to CLSI guidelines (3). Molecular characterization included pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (2), *spa* typing (7), multilocus sequence typing (MLST) (4), and Pantone-Valentine leukocidin (PVL) gene detection (10). The *SCCmec* type was determined by multiplex PCR (11) and amplification of the *ccr* genes (8, 9).

This MRSA strain presented a non-multidrug resistant profile, lacked PVL and was classified as *SCCmec* type V by the presence of a *ccrC* gene. MLST and *spa* typing assigned the strain as ST1120 and t065, respectively (Table 1). ST1120 was found to be a single locus variant of ST45 differing at the *aroE* locus. The strain was grouped into clonal complex (CC) 45 which has been previously found associated with both *SCCmec* type IV and V. The PFGE pattern did not match any of the international pandemic MRSA clones, including the ST239-III predominant clone in Brazil (5) but is very much related with the first *SCCmec* type V isolate (ST45) recently recovered in Portugal (1).

Although the Brazilian *SCCmec* type V strain has been recovered from a healthy child who had been exposed to known risk factors for HA-MRSA (hospitalization and antimicrobial use) its *SCCmec* type was rather compatible with CA-MRSA. However, it is not possible to

establish the epidemiology of the MRSA strain acquisition. Our findings emphasize the need for a continued molecular surveillance on MRSA with special concern to the dissemination of CA-MRSA into the Brazilian hospital setting.

This work was supported by the Brazilian Council for Research and Development/CNPq (Research Grant no. 482646/2007-1). J. Lamaro-Cardoso was supported by a grant (2366/06-1) from CAPES and A.L.S.S. Andrade by a grant (309196/2007-8) from CNPq.

## REFERENCES

1. **Aires-de-Sousa M., B. Correia, and H. de Lencastre; Multilaboratory Project Collaborators.** 2008. Changing patterns in frequency of recovery of Five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in portuguese hospitals:surveillance over a 16-year period. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2912-2917.
2. **Chung M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. Aires de Sousa, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sá-Leão, I. Santos Sanches, J. H. Song, P. T. Tassios, and P. Villari, Multilaboratory Project Collaborators.** 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**:189-198.
3. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S17. Clinical an Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. **Enright M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.***38**:1008-1015.
5. **Enright M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, and B . G. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:7687-7692.
6. **Grundmann H., M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, and E. Tiemersma.** 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* **368**:874-885.
7. **Harmsen D., H. Claus, W.Witte, J. Rothgänger, H. Claus, D. Turnwald, and U. Vogel.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5442-5448.
8. **Ito T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome

*mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1323-1336.

9. **Ito T., X. X. Ma, F. Takeuchi, K. Okuma, H. Yuzawa, and K. Hiramatsu.** 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:2637-2651.

10. **Lina G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin. Infect. Dis. **29**:1128-1132.

11. **Milheiro C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre.** 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:3374-3377.

12. **Naimi T. S., K. H. LeDell, K. Como-Sabetti, S. M. Borchardt, D. J. Boxrud, J. Etienne, S. K. Johnson, F. Vandenesch, S. Fridkin, C. O'Boyle, R. N. Danila, and R. Lynfield.** 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA **290**:2976-2984.

13. **O'Brien F. G., G. W. Coombs, J. C. Pearson, K. J. Christiansen, and W. B. Grubb.** 2005. Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:5129-513.

## **2º Artigo**

**Molecular epidemiology and risks factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day-care centers in Brazil.**

Artigo publicado na revista *Journal of Clinical Microbiology*

**Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day-care centers in Brazil.**

Juliana Lamaro-Cardoso<sup>1</sup>, Hermínia de Lencastre<sup>2,3</sup>, Andre Kipnis<sup>1</sup>, Fabiana C Pimenta<sup>1,4</sup>, Luciana S C Oliveira<sup>1</sup>, Renato M Oliveira<sup>1</sup>, Simonne Nouer<sup>5</sup>, Marta Aires-de-Sousa<sup>2,6</sup>, Catarina Milheiriço<sup>2</sup>, Ana Lucia Andrade<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Oeiras, Portugal

<sup>3</sup> The Rockefeller University, New York, NY10021, USA

<sup>4</sup> Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, USA

<sup>5</sup> Department of Preventive Medicine, College of Medicine, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, USA

<sup>6</sup> Escola Superior de Saúde da Cruz Vermelha Portuguesa (ESSCVP), Lisbon, Portugal

\* Corresponding author

Ana Lúcia Andrade, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, Esq. 1º Avenida, S. Leste Universitário, CEP: 74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone: 55 (62) 32027942, Fax: 55 (62) 32029051. E-mail: [ana@iptsp.ufg.br](mailto:ana@iptsp.ufg.br)

**(anexo .pdf)**