



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GIOVANA CAROLINA BODNAR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE  
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À  
METICILINA (MRSA) ISOLADAS NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA**

---

Londrina  
2014

GIOVANA CAROLINA BODNAR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE  
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À  
METICILINA (MRSA) ISOLADAS NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B668c Bodnar, Giovana Carolina.

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) isoladas no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina / Giovana Carolina Bodnar. – Londrina, 2014.  
56 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Coorientador: Marcia Regina Eches Perugini.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.  
Inclui bibliografia.

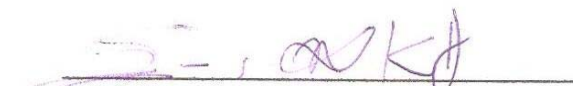
1. Estafilococos aureos – Genética – Teses. 2. Genética bacteriana – Teses. 3. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses.  
I. Nakazato, Gerson. II. Perugini, Marcia Regina Eches. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.  
IV. Título.

CDU 579.25

GIOVANA CAROLINA BODNAR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE AMOSTRAS  
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)  
ISOLADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Gerson Nakazato (Orientador)

Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Amabile de Campos  
Universidade de Brasília - UNB

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Megumi Yamauchi Lioni  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de abril de 2014.

*Aos meus queridos pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram para seguir em frente em meus estudos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me guiar nos momentos mais difíceis, me dar forças para continuar minha caminhada e por todas as oportunidades que foram colocadas no meu caminho.

À minha mãe Rosilda Aparecida Bodnar, por todo apoio e dedicação aos filhos, por sempre ter uma palavra amiga e de conforto nas horas difíceis permitindo que eu seguisse em frente com meu trabalho.

Ao meu pai Alcides Bodnar, que sempre incentivou meus estudos, me apoiou e é um exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao meu irmão Victor Ricardo Bodnar, pela paciência, amizade e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela oportunidade, apoio, dedicação, incentivo e compreensão nos trabalhos realizados. E por sempre me fazer acreditar que no final tudo daria certo.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Eches Perugini, por me incentivar a seguir na área de Microbiologia, por todo o apoio, ensino e compreensão.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Katsuko Takayama Kobayashi, pelo carinho e ajuda em momentos de dúvidas, pelos ensinamentos compartilhados.

Aos componentes da Banca de Defesa e Qualificação, por compartilharem seu conhecimento e me auxiliarem na composição deste trabalho.

Aos meus amigos que por muitas vezes foram compreensivos e apoiaram sempre minhas decisões.

Aos colegas e amigos do NIP3 por me receberem tão bem no laboratório, por colaborarem na execução do meu trabalho, por todo apoio, compreensão e momentos de descontração.

Aos alunos e professores do NIP5 pelo auxílio, apoio e companhia.

A todos os professores que contribuíram para meu aprendizado, compartilhando seus conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade, ensinamentos e aprimoramento dos meus conhecimentos.

Aos componentes das Bancas de Plano de Defesa e Qualificação, por me ajudarem na melhor composição deste trabalho e compartilharem seus conhecimentos.

À Universidade Estadual de Londrina e CNPq, pelo suporte financeiro e apoio para que esse trabalho se realizasse.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu mais profundo e sincero: **Muito Obrigada!**

BODNAR, G.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (mrsa) isoladas no hospital universitário da Universidade Estadual de Londrina.** 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

## RESUMO

Infecções causadas por bactérias multirresistentes são cada vez mais comuns e representam um grande problema para a saúde pública. *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes nestas infecções, sendo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) disseminado por todo o mundo. Além da resistência aos antimicrobianos, MRSA pode apresentar diversos fatores de virulência que contribuem para o aumento da patogenicidade desta bactéria. O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotípica e genotipicamente, 55 amostras de MRSA isoladas no Hospital Universitário, da Universidade Estadual de Londrina. As amostras bacterianas foram caracterizadas quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, produção de biofilme, e tipo de SCCmec. Para a identificação dos grupos clonais dessas amostras, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase utilizando os iniciadores RW3A, JB1 e BOX A1R. Os nossos resultados mostraram predominância do SCCmec II em nossas amostras de MRSA. SCCmec III, característico do Clone Endêmico Brasileiro foi observado em apenas quatro amostras e duas amostras apresentaram SCCmec IV, comumente relatado em amostras de MRSA comunitário. A maioria das amostras apresentou resistência a mais de quatro antimicrobianos testados e capacidade de produzir biofilme. A análise do polimorfismo de DNA mostrou que o iniciador JB1 discriminou melhor os grupos clonais de MRSA, mas o iniciador RW3A apresentou alguns grupos com características fenotípicas e genotípicas semelhantes. A análise clonal dessas amostras mostrou uma grande variabilidade genética. Nossos resultados são importantes para os estudos epidemiológicos envolvendo infecções por MRSA.

**Palavras chave:** Antimicrobianos. MRSA. Perfil genotípico. *Staphylococcus aureus*.

BODNAR, G.C. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) isolated at the university hospital of the Universidade Estadual de Londrina. 2014. 56 p. Master (Science in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

## ABSTRACT

Infections caused by multidrug-resistant bacteria are increasingly common and represent a great problem for public health. *Staphylococcus aureus* is one of the major agents of infections and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has been spread throughout the world. Besides antimicrobial resistance, MRSA can present several virulence factors that contribute to increased pathogenicity of this bacterium. The aim of this study was to characterize phenotypic and genotypically 55 MRSA strains isolated at the University Hospital of the Universidade Estadual de Londrina. Bacterial strains were characterized by antimicrobial susceptibility profile, biofilm production, and type of SCCmec. For the clonal groups identification of these strains was performed by Polymerase Chain Reaction using the RW3A, JB1 and BOX A1R primers. The most strains showed a predominance of SCCmec II. SCCmec III, characteristic of the Brazilian Epidemic Clone was observed only in four strains. Same, only two strains showed SCCmec IV, commonly reported in community-acquired MRSA strains. Most strains also showed resistance to more than four antimicrobials tested. Most strains also exhibited the ability to produce biofilm. The DNA polymorphism analysis showed that the JB1 primer showed higher discriminatory power, but RW3A primer showed some clonal groups of MRSA with similar genotypic and phenotypic characteristics. A clonal analysis of these strains showed a high genetic variability. Our results are important for epidemiological studies involving MRSA infections.

**Key-words:** Antimicrobial. Genotypic profile. MRSA. *Staphylococcus aureus*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| BEC                | Brazilian Endemic Clonal  |
| CA-MRSA            | Community acquired Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>     |
| ESBL               | Extended-Spectrum Beta-Lactamase  |
| HA-MRSA            | Health-care Associated Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| IS                 | Insertion Sequence  |
| MIC                | Minimum Inhibitory Concentration  |
| MLST               | Multilocus sequence typing  |
| MSSA               | Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>                        |
| MSCRAMM            | Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix molecules        |
| MRSA               | Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>                        |
| NAG                | N-acetilglicosamina   |
| NAM                | N-acetilmurâmico  |
| PBP                | Penicillin-binding Protein  |
| PBP' ou PBP2a      | Penicillin-binding Protein modificada                                     |
| PCR                | Polymerase Chain Reaction   |
| PFGE               | Pulsed field gel electrophoresis  |
| PVL                | Panton-Valentine Leukocidin   |
| REP                | Repetitive extragenic palindromic   |
| SCC <sub>mec</sub> | Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>                             |
| TSST               | Toxic shock syndrome toxin  |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>13</b> |
| 2.1      | Objetivo geral .....  | 13        |
| 2.2      | Objetivos específicos.....  | 13        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                    | <b>14</b> |
| 3.1      | <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                    | 14        |
| 3.2      | Fatores de virulência .....   | 15        |
| 3.3      | Resistência em <i>S. aureus</i> .....                                 | 17        |
| 3.4      | MRSA adquirido na comunidade .....                                    | 19        |
| 3.5      | Epidemiologia .....   | 21        |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>24</b> |
|          | <b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....  | <b>29</b> |
|          | <b>INTRODUCTION</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>1</b> | <b>MATERIALS AND METHODS</b> .....                                    | <b>33</b> |
| 1.1      | Bacteria .....  | 33        |
| 1.2      | Species identification and antimicrobial susceptibility profile ..... | 33        |
| 1.3      | Genotyping .....  | 34        |
| 1.4      | Similarity profile analysis .....                                     | 34        |
| 1.5      | Biofilm test in polystyrene surface .....                             | 35        |
| 1.6      | Statistical analysis .....  | 35        |
| <b>2</b> | <b>RESULTS</b> .....  | <b>35</b> |
| 2.1      | Species identification and antimicrobial susceptibility profile ..... | 35        |
| 2.2      | PCR for SCC <i>mec</i> typing .....                                   | 38        |
| 2.3      | Biofilm.....  | 38        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.4      | Analysis of genetic relatedness .....   | 38        |
| <b>3</b> | <b>DISCUSSION</b> .....   | <b>44</b> |
|          | <b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....  | <b>46</b> |
|          | <b>REFERENCES</b> .....   | <b>48</b> |
|          | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | <b>52</b> |
|          | <b>ANEXOS</b> .....   | <b>53</b> |
|          | ANEXO – Gel de agarose com os perfis de similaridade entre as amostras,<br>aplicando a técnica de PCR utilizando o primer RW3A..... | 53        |
|          | ANEXO – Gel de agarose com os perfis de similaridade entre as amostras,<br>aplicando a técnica de PCR utilizando o primer JB1 ..... | 53        |

## 1 1. INTRODUÇÃO

2

3           Infecções causadas por bactérias multirresistentes são cada vez  
4 mais comuns, e representam um grande problema para a saúde pública, causando  
5 uma elevada mortalidade e custos com o tratamento dos pacientes.

6           O uso indiscriminado de antimicrobianos na prática clínica faz com  
7 que as bactérias sofram cada vez mais pressão seletiva, adquirindo genes de  
8 resistência a diversas classes de antibacterianos, reduzindo as opções para o  
9 tratamento e aumentando o tempo de internação.

10           A bactéria *Staphylococcus aureus* é uma causa comum de  
11 infecções, sendo disseminada em diversos países do mundo. Dentro desta espécie,  
12 MRSA, também resistente à oxacilina, é responsável por uma série de infecções  
13 hospitalares, e também comunitária, podendo causar diversas doenças, como  
14 pneumonia, bacteremia, endocardite, osteomielite, formação de abscessos profundos  
15 e artrite séptica.

16           Vários clones de MRSA estão espalhados pelo mundo, e cada um  
17 deles apresenta algumas características distintas. O reconhecimento destes clones  
18 e sua disseminação nos hospitais são importantes para caracterizar o tipo de cepa  
19 circulante e associar ao tratamento adequado, visto que alguns clones apresentam  
20 resistência característica a determinadas classes de antimicrobianos. Por isso, a  
21 identificação destes clones é de fundamental importância para o controle de  
22 infecções hospitalares causadas por MRSA.

23           Algumas técnicas utilizadas para caracterizar o perfil genotípico  
24 destas amostras são demoradas, tem custo elevado e exigem o uso de  
25 equipamentos mais especializados. A execução de metodologias mais acessíveis,  
26 simples, e que permitam resultados significativos pode ajudar no entendimento da  
27 epidemiologia destas cepas e caracterização de amostras de locais que não tenham  
28 os recursos necessários para realizar pesquisas mais dispendiosas.

29           Informações obtidas desta análise clonal são importantes nos  
30 estudos epidemiológicos sobre MRSA, e contribuem para determinarmos as  
31 medidas de controle de infecções hospitalares e comunitárias.

32           Nosso grupo de pesquisa tem estudado fenotípica e  
33 genotipicamente amostras de MRSA, como também formas de combatê-las, através  
34 do desenvolvimento de novos antimicrobianos (naturais, nanopartículas e outras

1 alternativas). Inclusive, essas amostras estudadas fizeram parte de outros estudos  
2 envolvendo atividade antibacteriana, com uso de méis de abelhas indígenas  
3 (meliponíneos) e nanopartículas de prata conjugadas com outros antimicrobianos.

4

5

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente as amostras de MRSA isoladas de amostras de secreção, hemocultura, secreção traqueal e urocultura, de pacientes do Hospital Universitário de Londrina durante o ano de 2010.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos das amostras bacterianas;
- Determinar o tipo de SCC*mec* dessas amostras;
- Verificar a capacidade dessas amostras em produzir biofilme;
- Determinar a similaridade genética pela avaliação do polimorfismo;
- Comparar as técnicas utilizadas para a caracterização da similaridade do DNA.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbias facultativas, e não formam esporos. *Staphylococcus aureus* produz a enzima catalase, que converte  $H_2O_2$ , em  $H_2O$  e  $O_2$ , o que diferencia estafilococos de estreptococos. As espécies que compõem o gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em coagulase-positivas e coagulase-negativas (WINN et al., 2008).

As amostras identificadas como *S. aureus* subsp. *aureus*, subespécie frequentemente referida como *S. aureus*, estão entre as amostras de estafilococos mais frequentemente isoladas de seres humanos, sendo ainda a única subespécie desse gênero, dentre as patogênicas para humanos, que produz a enzima coagulase (BERGEY; HOLT, 1994).

*S. aureus* possui uma parede celular rígida externa à membrana citoplasmática, característica do grupo de bactérias Gram-positivas. O peptídeoglicano confere rigidez e resistência à lise osmótica da parede celular. Este é composto por dois açúcares alternados, o NAG (N-acetilglicosamina) e o NAM (N-acetilmurâmico), uma cadeia de quatro aminoácidos e uma ponte peptídica que entrecruza as cadeias. A enzima transpeptidase é quem catalisa as ligações cruzadas e reconhece o polímero vizinho à terminação *D-ala D-ala* efetuando a ligação intercadeia (MADIGAN, 2010).

Esta bactéria é encontrada na microbiota normal do sistema respiratório superior ou da pele. Geralmente causam infecções de pele e ferimentos, muitas vezes através da contaminação do indivíduo pela microbiota normal de outra pessoa. Ela pode tornar-se patogênica em determinadas situações, como a ruptura da barreira cutânea ou diminuição da imunidade do hospedeiro. Estima-se que aproximadamente 25 a 30% da população sejam colonizados por esta bactéria (GELATTI et al., 2009).

*S. aureus* pode causar várias doenças, como acne, furúnculos, pústulas, impetigo, pneumonia, osteomielite, endocardites, meningites, artrite, infecções pós-cirúrgicas e bacteremia. Infecções mais graves ocorrem quando a

1 resistência do hospedeiro encontra-se diminuída devido a situações que  
2 comprometem o sistema imune (GELATTI et al., 2009).

3 A maioria das cepas de *S. aureus* produz toxinas como alfa, beta e  
4 delta, e uma variedade de outras proteínas extracelulares, incluindo leucocidina,  
5 urease, lipase, gelatinase e fosfatase (HIRAMATSU, 1998).

6

### 7 3.2. FATORES DE VIRULÊNCIA

8

9 A capacidade desta bactéria em causar infecções está associada  
10 aos fatores de virulência que produzem. Estes estão ancorados à superfície celular  
11 bacteriana ou sendo secretados para o meio extracelular (KATAYAMA; ITO;  
12 HIRAMATSU, 2000).

13 Todas as cepas produzem uma enzima chamada coagulase que é  
14 responsável pela coagulação da fibrina e formação de um coágulo. Outras cepas  
15 podem produzir leucocidina, proteína que provoca destruição dos leucócitos. Outros  
16 fatores de virulência extracelulares, como enzimas proteolíticas, fibrinolisinase, lipase,  
17 ribonuclease e desoxirribonuclease também podem ser produzidos por *S. aureus*  
18 (BERGEY; HOLT, 1994).

19 Os fatores de virulência que estão ligados à parede celular incluem  
20 proteína A, proteína de ligação de fibronectina, fator de aglutinação e componentes  
21 microbianos que reconhecem MSCRAMM como, receptores no hospedeiro humano  
22 e outras proteínas de superfície. Os MSCRAMM da superfície celular são produzidos  
23 durante a fase exponencial de crescimento. Sua função é proporcionar nutrientes  
24 necessários para a sobrevivência do hospedeiro, assim como a proteção de células  
25 microbianas a partir do sistema imune durante a formação de lesão (SCHLIEVERT  
26 et al., 2010).

27 Um fator de virulência de grande importância médica produzido por  
28 algumas cepas de *S. aureus* são as leucocidinas e uma das mais importantes é a  
29 PVL (*Panton-Valentine Leukocidin*), codificada pelo gene *pvl*. Esta citotoxina tem a  
30 capacidade de lisar células brancas e de mediar a necrose tecidual em diferentes  
31 tecidos e órgãos, incluindo órgãos vitais, como os pulmões. Em indivíduos saudáveis  
32 pode causar infecções grave de pele e tecidos mole, como, piomiosite, abscessos,  
33 abscessos mamários, fascite necrotizante e pneumonia. Está associada com MRSA  
34 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) de pacientes comunitários e é

1 codificada por dois genes, *lukF-PV* e *lukS-PV*, os quais residem em um profago  
2 integrado ao cromossomo (LINA et al., 1999).

3           Nos países em desenvolvimento, como África e alguns países  
4 asiáticos, a frequência de amostras de CA-MRSA (*Community acquired Methicillin-*  
5 *resistant Staphylococcus aureus*), contendo o gene *pvl*, é alta se comparado com  
6 outras localidades geográficas. Um estudo realizado por pesquisadores da Índia  
7 demonstrou que 40% dos isolados apresentaram o gene *pvl* entre amostras de CA-  
8 MRSA (ABIMANYU et al., 2013).

9           TSST (*Toxic shock syndrome toxin*) é um exemplo de exotoxina que  
10 faz parte do grupo dos superantígenos, juntamente com toxina esfoliativa e  
11 enterotoxina estafilocócica. A síndrome do choque tóxico é decorrente de infecção  
12 por *S. aureus* e provoca febre alta, erupções, vômito, diarreia e, ocasionalmente,  
13 morte. Os superantígenos são capazes de induzir febre e amplificar o efeito letal de  
14 outras moléculas tóxicas, incluindo lipopolissacarídeos. Devido a isto tem extrema  
15 importância nas infecções bacterianas (SCHLIEVERT et al., 2010).

16           Como muitas proteínas plasmáticas podem se ligar a superfícies de  
17 material plástico e outras superfícies lisas, a ligação da bactéria a essas proteínas  
18 possibilita, por sua vez, sua fixação a biomateriais durante a infecção no hospedeiro  
19 formando o biofilme. Tal propriedade é importante em processos patogênicos  
20 associados às infecções hospitalares, envolvendo o uso de cateteres e próteses  
21 médicas, podendo levar a processos infecciosos graves, tal qual, bacteremias e  
22 infecções disseminadas, no caso, principalmente, de cateteres endovenosos. Por  
23 outro lado, a produção do biofilme na superfície de próteses médicas pode resultar  
24 em intervenção cirúrgica para a remoção da prótese contaminada (SALYERS,  
25 2002).

26           Muitos pacientes dependem de cateteres e implantes de válvulas e  
27 próteses. Neste tipo de material pode ocorrer aderência bacteriana e formação de  
28 biofilme (STEPANOVIC et al., 2000). O biofilme é formado por uma colonização de  
29 micro-organismos envolta por uma matriz extracelular amorfa, principalmente  
30 material polissacarídeo. A comunicação entre as bactérias envoltas pelo biofilme  
31 ocorre pela elaboração e reconhecimento de pequenas moléculas, mecanismo  
32 chamado de *quorum sensing* (SAGINUR et al., 2006). Estas bactérias ficam  
33 protegidas da ação de antimicrobianos e detergentes, que não conseguem agir no

1 local. A formação de biofilme tem grande importância no contexto médico, ambiental  
2 e industrial (STEPANOVIC et al., 2007).

### 3 4 3.3. RESISTÊNCIA EM *S. AUREUS*

5  
6 Apesar da disponibilidade de estratégias preventivas e terapêuticas  
7 eficazes, MRSA continua a ser uma das principais causas de infecções associadas  
8 aos cuidados de saúde e, mais recentemente, das infecções adquiridas na  
9 comunidade. Alguns autores definem como infecção hospitalar, comunitária, ou  
10 associada á serviços de saúde as seguintes situações:

- 11 a) Infecção hospitalar: aquela que ocorre após 48 horas de  
12 internação (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008);  
13 b) Infecção adquirida na comunidade: aquela que ocorre antes de 48  
14 horas de internação e sem internação prévia (CAIAFFA-FILHO  
15 et al., 2013);  
16 c) Infecção associada a serviços de saúde: se o paciente já esteve  
17 internado em algum hospital, casas de saúde, ou outro serviço  
18 de saúde durante os 12 meses anteriores à infecção, com  
19 cultura positiva dentro das 48 horas após a internação  
20 (CAIAFFA-FILHO et al., 2013).

21 Os primeiros antimicrobianos a serem inseridos na prática clínica  
22 foram os beta-lactâmicos e são até então uma das classes mais efetivas utilizadas  
23 na medicina. Em 1960, iniciou-se o uso da meticilina, uma penicilina semi-sintética,  
24 específica para o tratamento de infecções causadas por estafilococos produtores de  
25 beta-lactamase (IWG-SCC, 2009). Desde a introdução da meticilina, as epidemias  
26 devido a diferentes clones de MRSA ocorreram em diversas regiões geográficas. O  
27 resultado tem sido a persistência de MRSA como um importante patógeno em todo o  
28 mundo (LOWY, 2013).

29 Os mecanismos de resistência à meticilina em estafilococos podem  
30 ocorrer devido à inativação do antimicrobiano pelas enzimas beta-lactamases, pela  
31 produção de PBP (*Penicillin-binding Protein*) com baixa capacidade de ligação à  
32 penicilina, e também pela aquisição do gene *mecA* (BRUMFITT; HAMILTON-  
33 MILLER, 1989). Este gene codifica novas proteínas, também chamadas de PBP2a  
34 ou PBP2' (*Penicillin-binding Protein* modificada), que substitui as outras proteínas de

1 ligação à penicilina na membrana e tem baixa afinidade não só para a oxacilina  
2 como para os outros antimicrobianos beta-lactâmicos (SCHITO, 2006). O  
3 gene *mecA* pertence a um cassete cromossômico chamado SCC*mec*  
4 (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que é um elemento genético móvel e  
5 também pode conter outros genes de resistência a antimicrobianos (LOWY, 2003).

6 Elementos SCC*mec* são altamente diversos em sua estrutura  
7 organizacional e conteúdo genético, podendo ser classificados em tipos e subtipos.  
8 Isto é comum na prática para definir clones de MRSA pela combinação do tipo de  
9 SCC*mec* e tipo de sequência, definida pela técnica de MLST (*Multilocus sequence*  
10 *typing*) (IWG-SCC, 2009).

11 Algumas características são comuns entre os diferentes tipos de  
12 SCC*mec*, tais como, a presença do *mecA* no complexo do gene *mec*, o que confere  
13 resistência; transporte de *ccr* (*ccrAB* e/ou *ccrC*) no gene *ccr*, que é um sítio de  
14 recombinases; e integração do cassete cromossomal em um local específico do  
15 cromossomo, realizada por uma IS (*Insertion Sequence*), o qual serve como um  
16 marcador para recombinação mediada por *ccr* (IWG-SCC, 2009).

17 Os tipos de SCC*mec* são definidos pelo tipo do complexo de genes  
18 *ccr* e gene *mec*. Estes são os elementos chave responsáveis pela a integração e  
19 excisão do cassete SCC*mec*; e pelo fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos  
20 (IWG-SCC, 2009).

21 Os primeiros SCC*mec* foram designados como tipo I, II e III (ITO et  
22 al., 2001; ITO; KATAYAMA; HIRAMATSU, 1999). Em seguida surgiram os tipos IV a  
23 VIII (BERGLUND et al., 2008; ITO et al., 2004; MA et al., 2002; OLIVEIRA;  
24 MILHEIRICO; DE LENCASTRE, 2006; ZHANG et al., 2009). Mais recentemente os  
25 tipos IX, X (LI et al., 2011) e XI (IWG-SCC, 2013). Elementos SCC*mec* variam em  
26 tamanho de 20 kb (tipo IV e VI) a 67 kb (tipo III), mas a região *mecA* (2 kb)  
27 representa apenas uma pequena proporção do elemento SCC*mec*  
28 (CHONGTRAKOOL et al., 2006; DEURENBERG et al., 2007).

29 Os SCC*mec* tipo I, II e III foram encontrados em cepas MRSA de  
30 origem hospitalar (HA-MRSA) e tem como característica a resistência a múltiplos  
31 antimicrobianos além dos beta-lactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos,  
32 tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol e quinolonas (HIRAMATSU, 1998). Os  
33 SCC*mec* tipo IV e V geralmente não possuem nenhum outro determinante de  
34 resistência a antimicrobianos além do gene *mecA*, o que explica uma das principais

1 características dos isolados CA-MRSA, a sensibilidade a diversos antimicrobianos  
2 não beta-lactâmicos (ENRIGHT et al., 2002; ITO et al., 2004).

3 O desenvolvimento de novos antimicrobianos, incluindo  
4 oxazolidinonas, lipopeptídeos, glicilciclinas, cetolídeos e as novas gerações de  
5 fluoroquinolonas, beta-lactâmicos e glicopeptídeos devem permanecer uma  
6 prioridade para a continuação do tratamento eficaz das infecções causadas por  
7 cepas resistentes de *S. aureus* (WOODFORD; LIVERMORE, 2009). Entretanto,  
8 relatos de resistência causando falha terapêutica com linezolid (GU et al., 2013),  
9 daptomicina (MARTY et al., 2006), telitromicina (OKSUZ; GURLER, 2013) ou  
10 fluoroquinolonas mais recentes (CHARBONNEAU et al., 2006) são motivos para  
11 preocupação. A emergência da resistência aos antimicrobianos é inevitável, porém  
12 deve-se tentar reduzir o seu impacto e prolongar a eficácia dos agentes disponíveis  
13 no mercado (WOODFORD; LIVERMORE, 2009).

14 Estudos indicam que o tratamento com antibióticos adequados pode  
15 reduzir em 24% a taxa de mortalidade entre pacientes com infecções hospitalares  
16 (LUNA et al., 2010).

#### 18 3.4. MRSA ADQUIRIDO NA COMUNIDADE

20 Durante a década de 90, MRSA surgiu como uma causa de infecção  
21 entre pessoas saudáveis na comunidade e que não tinham nenhum dos fatores de  
22 risco associados à HA-MRSA (DAVID; DAUM, 2010).

23 Geralmente os pacientes com CA-MRSA apresentam infecções de  
24 pele e tecidos mole, mas também podem ocorrer infecções mais invasivas, incluindo  
25 sepse, pneumonia e fascite necrotisante. Surtos de infecção por CA-MRSA ocorrem  
26 entre presidiários, praticantes de esportes, recrutas militares e recém-nascidos  
27 saudáveis. Fatores que parecem facilitar a transmissão de CA-MRSA incluem o  
28 contato frequente da pele-a-pele, aglomeração, comprometimento da integridade da  
29 pele, compartilhamento de itens potencialmente contaminados, e a falta de higiene  
30 pessoal (BENOIT et al., 2008).

31 Assim como HA-MRSA, CA-MRSA também possui resistência aos  
32 antimicrobianos beta-lactâmicos, conferidos pelo elemento *SCCmec*. Entretanto, as  
33 cepas de CA-MRSA são tipicamente menos resistentes às outras classes de  
34 antimicrobianos utilizadas como tratamento para infecções por *S. aureus*. Cepas CA-

1 MRSA geralmente são classificadas como *SCCmec* IV, V, ou VI, enquanto que  
2 cepas HA-MRSA geralmente contêm tipos de *SCCmec* I, II, e III. Cepas CA-MRSA  
3 normalmente possuem a toxina PVL, que tem sido associada com abscessos de  
4 pele e pneumonia (BENOIT et al., 2008).

5 O primeiro estudo realizado por pesquisadores brasileiros relatou um  
6 caso de infecção por CA-MRSA na cidade de Porto Alegre. Pesquisadores sugerem  
7 que, isolados ambulatoriais de MRSA exibindo baixa MIC (*Minimum Inhibitory*  
8 *Concentration*) de oxacilina e meticilina, e uma ampla sensibilidade a outras classes  
9 de antimicrobianos devem ser considerados indicativos de possíveis casos de CA-  
10 MRSA, e estudos genéticos, incluindo eletroforese em gel de campo pulsado  
11 (PFGE), tipo de *SCCmec*, detecção de genes codificadores da toxina PVL e MLST  
12 devem ser realizados para melhor caracterização de tais bactérias (RIBEIRO et al.,  
13 2005).

14 Pesquisas nos EUA indicam o aumento da incidência de infecções  
15 associada à comunidade. Como observado pelos autores, o estudo destaca a  
16 necessidade de uma maior compreensão de como essas cepas de MRSA se  
17 espalham e iniciam a infecção na comunidade. Os riscos identificados no ambiente  
18 hospitalar não são os mesmos que os relacionados aos da comunidade. Enquanto  
19 as famílias parecem ser um importante reservatório de MRSA na comunidade,  
20 outros locais ou modos de propagação ainda precisam ser identificados (LOWY,  
21 2013).

22 Alguns pesquisadores procuram evidências para indicar a origem de  
23 resistência comunitária em *S. aureus* e apontam que pessoas que vivem perto de  
24 grandes fazendas, ou de grandes áreas de pecuária estão em maior risco de  
25 desenvolver infecções por MRSA ou alguma outra infecção bacteriana (CASEY et  
26 al., 2013).

27 Oitenta por cento dos antibióticos usados atualmente nos Estados  
28 Unidos são utilizados para a melhoria do crescimento do gado criado nas grandes  
29 fazendas e a maior parte desses antibióticos é eliminada como dejetos orgânicos.  
30 Muitos dos antibióticos utilizados nestas propriedades são da mesma classe de  
31 antibióticos utilizados para tratar infecções humanas. O uso intenso destes  
32 antibióticos para melhoria do crescimento do gado pode resultar na seleção de  
33 bactérias resistentes aos antimicrobianos e estas podem espalhar-se para os seres  
34 humanos, causando infecções de difícil tratamento (CASEY et al., 2013).

1 Outra forma de propagação pode ocorrer por carnes introduzidas na  
2 alimentação. Recentemente alguns autores identificaram *Escherichia coli* contendo  
3 ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) em carne de frango, e estas foram  
4 semelhantes para as espécies encontradas em seres humanos. Vários estudos têm  
5 demonstrado que os genes que conferem resistência aos antimicrobianos são  
6 facilmente encontrados em esgotos, solo e composto orgânico (KLUYTMANS et al.,  
7 2013).

8 Em um dos primeiros estudos relacionando infecções por MRSA e  
9 proximidade com grandes áreas de agropecuária ou áreas com composto orgânico,  
10 os autores investigaram se aerossóis de compostos orgânicos que continham  
11 bactérias podem propagar-se e causar infecções nas pessoas que vivem nas  
12 proximidades das fazendas (CASEY et al., 2013).

### 14 3.5. EPIDEMIOLOGIA

16 A descoberta de *S. aureus* durante 1880, caracterizou esta bactéria  
17 como bactéria oportunista, potencialmente patogênica associada a diversos  
18 processos infecciosos, desde pequenas infecções de pele a infecções de feridas  
19 pós-operatórias, bacteremia, osteomielite, endocardite e pneumonia (LOWY, 2003).

20 O método de PFGE é realizado em diversos estudos de  
21 epidemiologia molecular de MRSA, sendo utilizado como critério para a classificação  
22 inicial de isolados de MRSA em linhagens clonais. Este método é considerado o  
23 padrão-ouro na tipagem molecular de *S. aureus*, pois apresenta excelente poder  
24 discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade. A PFGE é capaz de detectar  
25 rearranjos e aquisição ou perda de determinantes genéticos, ou seja, eventos  
26 genéticos que ocorrem em períodos relativamente curtos (OLIVEIRA; TOMASZ; DE  
27 LENCASTRE, 2002).

28 Um estudo avaliou 83 cepas de MRSA isoladas de pacientes  
29 internados em hospitais públicos e privados em 19 diferentes cidades localizadas em  
30 14 estados do Brasil durante os anos de 1995 a 1997. A tipagem foi realizada  
31 através de antibiograma e PFGE. A análise do DNA genômico pela técnica de PFGE  
32 demonstrou que 65 isolados eram pertencentes ao mesmo padrão, indicando a  
33 presença de um clone endêmico de MRSA disseminado pelos hospitais do Brasil  
34 (BEC - *Brazilian Endemic Clonal*). Todos os isolados pertencentes a este clone eram

1 resistentes a ciprofloxacina, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, e  
2 tetraciclina (OLIVEIRA; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2001).

3 Estudos do Programa de Vigilância do SENTRY indicaram que *S.*  
4 *aureus* continua a ser o patógeno predominante de infecções de pele e tecidos  
5 moles na América e Europa, no período compreendido entre 1998 a 2004 (MOET et  
6 al., 2007). No Brasil as taxas de infecção por MRSA encontram-se entre 30 e 50%,  
7 dependendo da região analisada (MARTINS et al., 2014).

8 Foi realizado o polimorfismo pela técnica de PFGE em amostras  
9 coletadas nos hospitais de cinco cidades do Brasil (Rio de Janeiro, Niterói, São  
10 Paulo, Porto Alegre e Manaus). Pesquisadores analisaram 152 isolados, e  
11 identificaram 85 como sendo MRSA, onde se observou similaridade entre as  
12 amostras, indicando a presença de um único clone espalhado nas diferentes regiões  
13 analisadas, denominado de BEC (TEIXEIRA et al., 1995).

14 O Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná analisou  
15 107 isolados de MRSA provenientes de pacientes internados na UTI adulto em um  
16 período de quatro anos. Estes isolados foram tipados pela técnica molecular de  
17 PFGE, sendo identificados seis perfis eletroforéticos distintos, com a prevalência de  
18 80,4% de um só clone. Este clone apresentou similaridade superior a 85% quando  
19 comparado ao BEC (ROSA, 2009).

20 Métodos baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) oferecem  
21 as vantagens de velocidade e facilidade para realizar o polimorfismo de cepas de  
22 MRSA (OLIVE; BEAN, 1999). REP PCR (*Repetitive extragenic palindromic PCR*) -  
23 análise baseada em elementos multicópia do genoma de estafilococos mostrou boa  
24 reprodutibilidade e poder discriminatório em análises de polimorfismo (DEPLANO et  
25 al., 2000; NETTO DOS SANTOS et al., 2001). Nos estudos realizados por estes  
26 pesquisadores o PFGE discriminou seis diferentes padrões entre isolados de MRSA  
27 e MSSA (*Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*), enquanto o REP-PCR  
28 mostrou cinco padrões.

29 A análise genotípica de 28 amostras utilizando o iniciador RW3A na  
30 metodologia de REP-PCR, identificou a presença de 2 clones distintos. Esta  
31 caracterização também foi baseada nas técnicas de MLST e tipo de SCC*mec*. A  
32 análise quantitativa de RW3A demonstrou similaridade entre os clones de pelo  
33 menos 60%. O método de genotipagem que foi utilizado no estudo apresentou um

1 alto poder discriminatório, separando bem dois clones, comunitário e hospitalar  
2 (LIAO et al., 2006).

3 Outra pesquisa realizada pela Universidade Estadual de Maringá  
4 para avaliar o perfil de similaridade entre 61 amostras de *S. aureus* obtidas de  
5 pacientes da UTI de um hospital geral da região norte do Paraná, também utilizou o  
6 iniciador RW3A. Foi encontrada similaridade superior a 80% em 27 amostras e as  
7 demais 34 variaram o grau de similaridade entre 20% e 80%. Seis amostras isoladas  
8 apresentaram grau de similaridade de 100% (MOREIRA; SANTOS; BEDENDO,  
9 2012).

10 O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia  
11 realizou uma pesquisa com pacientes admitidos entre os anos de 2000 e 2002 e  
12 mostrou que os isolados caracterizados por REP-PCR apresentaram os mesmos  
13 subtipos encontrados pelo método PFGE, exceto para as cepas de dois dos nove  
14 pacientes avaliados. A caracterização molecular de isolados de MRSA mostrou um  
15 padrão único PFGE (tipo A) semelhante ao MRSA do clone endêmico brasileiro.  
16 Embora PFGE mostrasse maior poder discriminatório, REP-PCR é um método  
17 diagnóstico simples e rápido de análise molecular e que também pode ser utilizado  
18 como uma técnica de avaliação inicial para investigar isolados de infecções por *S.*  
19 *aureus* (SADOYAMA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 1995).

20 BEC (*SCCmec* tipo III, ST 239) tem sido o tipo predominante em  
21 infecções de alguns hospitais do país (CAVALCANTE et al., 2014; ROSSI, 2011;  
22 SADER et al., 1994; TEIXEIRA et al., 1995). Entretanto um estudo realizado com  
23 cinquenta isolados de MRSA obtidos do Hospital das Clínicas, da Universidade de  
24 São Paulo, Brasil demonstrou que o *SCCmec* predominante foi o tipo II (60%),  
25 seguido de 26% do tipo IV e apenas 6% dos isolados foram do tipo III (CAIAFFA-  
26 FILHO et al., 2013).

27 Estudos relacionando o tipo de *SCCmec* com o perfil genotípico e  
28 análise epidemiológica das amostras são importantes para verificar a disseminação  
29 e caracterizar isolados de MRSA no Brasil. Sendo que estes estudos permitem  
30 conhecer genotipicamente os micro-organismos circulantes na região, contribuindo  
31 também para o controle de infecção hospitalar.

## REFERÊNCIAS

- ABIMANYU, N. et al. Use of Triplex PCR for Rapid Detection of PVL and Differentiation of MRSA from Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci. **J Clin Diagn Res**, v. 7, n. 2, p. 215-218 2013.
- BENOIT, S. R. et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 1216-1223 2008.
- BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed / [edited by] John G. Holt ... [et al.]. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins, 1994. ISBN 0683006037.
- BERGLUND, C. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 10, p. 3512-3516 2008.
- BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **N Engl J Med**, v. 320, n. 18, p. 1188-1196 1989.
- CAIAFFA-FILHO, H. H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, n. 4, p. 518-520 2013.
- CASEY, J. A. et al. High-density livestock operations, crop field application of manure, and risk of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Pennsylvania. **JAMA Intern Med**, v. 173, n. 21, p. 1980-1990 2013.
- CAVALCANTE, F. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among patients in different wards at a Brazilian teaching hospital. **J Hosp Infect**, v. 86, n. 2, p. 151-154 2014.
- CHARBONNEAU, P. et al. Fluoroquinolone use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolation rates in hospitalized patients: a quasi experimental study. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 6, p. 778-784 2006.
- CHONGTRAKOOL, P. et al. 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*mec* elements. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1001-1012 2006.
- DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 3, p. 616-687 2010.
- DEPLANO, A. et al. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The

European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 10, p. 3527-3533 2000.

DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, n. 3, p. 222-235 2007.

ENRIGHT, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7687-7692 2002.

GELATTI, L. C. et al. [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination]. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 5, p. 501-506 2009.

GU, B. et al. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 1, p. 4-11 2013.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in staphylococci. **Drug Resist Updat**, v. 1, n. 2, p. 135-150 1998.

HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control**, v. 36, n. 5, p. 309-332 2008.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1323-1336 2001.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 6, p. 1449-1458 1999.

ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 7, p. 2637-2651 2004.

IWG-SCC. **Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements.** Antimicrob Agents Chemother. 53: 4961-4967 p. 2009.

\_\_\_\_\_. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements. 2013. Disponível em: < <http://www.sccmec.org/> >. Acesso em: 20/01.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 6, p. 1549-1555 2000.

KLUYTMANS, J. A. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 4, p. 478-487 2013.

LI, S. et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 3046-3050 2011.

LIAO, R. S. et al. 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**, v. 44, n. 6, p. 2254-2257 2006.

LINA, G. et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 5, p. 1128-1132 1999.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273 2003.

LOWY, F. D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Where Is It Coming From and Where Is It Going? **JAMA Internal Medicine**, p. E1-E2 2013.

LUNA, C. M. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Braz J Infect Dis**, v. 14 Suppl 2, p. S119-127 2010.

MA, X. X. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 4, p. 1147-1152 2002.

MADIGAN, E. A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2010.

MARTINS, A. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. **Braz J Infect Dis**, 2014.

MARTY, F. M. et al. Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 595-597 2006.

MOET, G. J. et al. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 57, n. 1, p. 7-13 2007.

MOREIRA, A. C. M. G.; SANTOS, R. R.; BEDENDO, J. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes e membros da equipe de enfermagem. **Cogitare Enferm** v. 17, n. 3, p. 437-443 2012.

NETTO DOS SANTOS, K. R. et al. Typing of *Staphylococcus aureus* from surgical site infections: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR technique using repetitive extragenic palindromic (rep) and Tn916-Shine-Dalgarno (TnSD) target sequences. **Int J Med Microbiol**, v. 291, n. 3, p. 231-236 2001.

OKSUZ, L.; GURLER, N. Susceptibility of clinical methicillin-resistant Staphylococci isolates to new antibiotics. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, n. 11, p. 825-831 2013.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669 1999.

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRICO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 10, p. 3457-3459 2006.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. **Microb Drug Resist**, v. 7, n. 4, p. 349-361 2001.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 180-189 2002.

RIBEIRO, A. et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 1985-1988 2005.

ROSA, A. W. **Caracterização fenotípica e tipagem molecular de MRSA isolados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**. 2009. (Mestrado). Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143 2011.

SADER, H. S. et al. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 15, n. 5, p. 320-323 1994.

SADOYAMA, G. et al. *Staphylococcus aureus* as source of catheter-related bloodstream infection evaluated by PFGE and rep-PCR typing in a Brazilian hospital. **APMIS**, v. 116, n. 11, p. 953-960 2008.

SAGINUR, R. et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 55-61 2006.

SALYERS, A. A. W., D.D. . Bacterial strategies for evading or surviving the defense systems of the human body. In: PRESS, A. (Ed.). **Bacterial Pathogenesis – a molecular approach**. 2 ed. Washington; D.C, 2002.

SCHITO, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect**, v. 12 Suppl 1, p. 3-8 2006.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 1, p. 39-49 2010.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179 2000.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899 2007.

TEIXEIRA, L. A. et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2400-2404 1995.

WINN, W. J. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. 6ª ed. Rio de Janeiro 2008. 1565 p.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **J Infect**, v. 59 Suppl 1, p. S4-16 2009.

ZETOLA, N. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 5, p. 275-286 2005.

ZHANG, K. et al. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p. 531-540 2009.

## ARTIGO CIENTÍFICO

### PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* STRAINS (MRSA) ISOLATED AT THE UNIVERSITY HOSPITAL OF THE UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Giovana Carolina Bodnar<sup>1</sup>, Heloísa Moreira Martins<sup>1</sup>, Caio Ferreira de Oliveira<sup>1</sup>, Juscélio Donizete Cardoso<sup>3</sup>, Marcia Regina Eches Perugini<sup>2</sup>, Lucy Megumi Yamauchi<sup>1</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>1</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>1</sup>, Gerson Nakazato<sup>1\*</sup>

- <sup>1</sup>. *Department of Microbiology, Biological Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, CP 86005-990, Brazil.*
- <sup>2</sup>. *Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Universidade Estadual de Londrina, CP86038-440, Londrina, PR, Brazil.*
- <sup>3</sup>. *Laboratory of Microbiology of soil, Instituto Agrônômico do Paraná, Cx Postal 481, CEP 86047-902, Londrina, PR, BraZil.*

**\*Corresponding author:** Gerson Nakazato, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86057-970, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55(43) 3371-4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, e-mail: gnakazato@uel.br.

## ABSTRACT

Infections caused by multidrug-resistant bacteria are increasingly common and represent a great problem for public health. *Staphylococcus aureus* is one of the major agents of infections and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has been spread throughout the world. Besides antimicrobial resistance, MRSA can present several virulence factors that contribute to increased bacterial pathogenicity. The aim of this study was to characterize phenotypic and genotypically 55 MRSA isolates in the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, during 2010 year. Bacterial isolates were characterized by antimicrobial susceptibility profile, biofilm production, and type of SCC*mec*. For the clonal groups identification of these isolates was performed by Polymerase Chain Reaction using the RW3A, JB1 and BOX A1R primers. The majority of isolates showed a predominance of SCC*mec* II. SCC*mec* III, characteristic of the Brazilian Endemic Clone was observed in four strains. Only two isolates showed SCC*mec* IV, reported in community-acquired MRSA strains. Most isolates also showed resistance to more than four antimicrobials tested. Some isolates exhibited the ability to produce biofilm. The DNA polymorphism analysis showed that the JB1 primer showed higher discriminatory power, but RW3A primer showed some clonal groups of MRSA with similar genotypic and phenotypic characteristics. A clonal analysis of these isolates showed a high genetic variability. These results are important for epidemiological studies involving MRSA infections.

**Key-words:** antimicrobial, MRSA, genotypic profile, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is a major cause of infections in both healthcare facilities and community, causing pneumonia, bacteremia, endocarditis, osteomyelitis, abscesses and septic arthritis.

Since the introduction of methicillin in 1960, outbreaks due to different clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have been occurred in different regions (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; CDC, 2013; HIRAMATSU et al., 2001; JOHNSON, 2011; LIVERMORE, 2000; OLIVEIRA, G. A. et al., 2001; SONG et al., 2011), contributing to the persistence of MRSA as an important pathogen worldwide (LOWY, 2013).

The Center for Disease Control and Prevention (CDC) of USA reported that more than 80,000 illness and 11,000 deaths in the hospital settings were caused by MRSA during 2011. Compared to earlier periods, there was a 31% decline in global rates of MRSA invasive infections. The largest decrease (54%) was observed in infections in patients during hospitalization, this is due to preventive measures, which are important for controlling outbreaks of infection (CDC, 2013).

Both healthcare-associated MRSA (HA-MRSA) and community-acquired MRSA (CA-MRSA) have resistance to beta-lactam antimicrobials. However, CA-MRSA strains are typically less resistant to other classes of antimicrobials. The oxacillin resistance is encoded by *mecA* gene that is located into the staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*). HA-MRSA strains are classified as SCC*mec* I, II or III, whereas CA-MRSA strains containing SCC*mec* types generally IV, V, and VI. CA-MRSA strains may have PVL toxin, which has been associated with skin abscesses, and necrotizing pneumonia (BENOIT et al., 2008).

SCC*mec* elements are highly diverse in their organizational structure and gene content, allowing the discrimination into types and subtypes. Were described SCC*mec* type I to XI (BERGLUND et al., 2008; ITO et al., 2001; ITO; KATAYAMA; HIRAMATSU, 1999; ITO et al., 2004; IWG-SCC, 2013; LI et al., 2011; MA et al., 2002; OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRICO; DE LENCASTRE, 2006; ZHANG et al., 2009). SCC*mec* vary in size from 20 kb to 67 kb, but the *mecA* region (2 kb) represents only a small proportion of the chromosomal cassette SCC*mec* (CHONGTRAKOOL et al., 2006; DEURENBERG et al., 2007).

The genetic relatedness of MRSA isolates has been analyzed by different methodologies. The gold standards for this analysis are pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST), but these techniques are expensive, time consuming, laborious and are not accessible to all research laboratories (ENRIGHT et al., 2000; OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2002).

Polymerase Chain Reaction (PCR) - based methods to analyze genetic relatedness of MRSA strains offer the advantage of being faster and easier to perform (OLIVE; BEAN, 1999). Overall, repetitive sequences with unknown function are found in genomic DNA from different bacterial species (MIRANDA; SINGH; MURRAY, 1991). These regions have been used to determine the DNA genetic similarity between several bacterial species, including MRSA (DEL VECCHIO et al., 1995; MOREIRA; SANTOS; BEDENDO, 2012; VERSALOVIC et al., 1994).

The RW3A, JB1 and BOX were used initially to evaluate the clonality of some bacteria. RW3A primer was derived from *Mycoplasma pneumoniae* repetitive sequence (RepMP3) (WENZEL; HERRMANN, 1988) and was applied in researches with MRSA (DEL VECCHIO et al., 1995; MOREIRA et al., 2012). The JB1 primer was sequenced from *Enterococcus faecium* and was useful for differentiating *E. faecalis* strains (BEDENDO; PIGNATARI, 2000), other Gram-positive bacteria which can transfer the resistance genes to *S. aureus*. BOX elements contain subsequences differentially conserved, represent the first repeating element of a Gram-positive organism (*Streptococcus pneumoniae*) (VERSALOVIC et al., 1994) and was used to characterize different species of *Staphylococcus* (WIESER; BUSSE, 2000).

The aim of this study was characterize MRSA isolated from patients at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, during 2010, by phenotypic and genotypic methods. All isolates were tested for antimicrobial susceptibility, SCCmec typing and biofilm formation capacity. In addition the genetic diversity between the isolates was analyzed by three PCR-based methods using repetitive DNA as target.

## 1. MATERIALS AND METHODS

### 1.1. Bacteria

MRSA were isolated from patients at the University Hospital of Londrina during 2010 year. The bacteria were stored in the bacterial collection of the Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis from University Hospital of Universidade Estadual de Londrina (UH/UEL). A total of 55 isolates, were obtained from secretion (n=27), blood (n=15), tracheal secretion (n=9) and urine (n=4). MRSA BEC 9393 (SOARES et al., 2001) and N315 (KURODA et al., 2001) provided by Dr. Agnes Marie Sá Figueiredo (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, Brazil) and Dr. Elsa Masae Mamizuka (Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brazil), respectively. Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) were used as reference strains ATCC (American Type Culture Collection) 25923 and 29213. All bacteria were stored at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®) plus 25% glycerol (Sigma®).

The protocols of this study were in accordance with the National Research Council, and approved by the Ethics and Human Research of UEL (protocol 186/09 – CEP/UEL).

### 1.2. Species identification and antimicrobial susceptibility profile

The species identification and the antimicrobial susceptibility profile were performed by an automated method using the Microscan system (Siemens®). Species identification was confirmed by PCR using specific primers for gene *coa* (coagulase) (*coa* F 5'GGGATAACAAAGCAGATGCGATAG 3' and *coa* R 5' ACGTTGATTGAGTACCTTGTGG 3') according to Tiwari et al (2008). The following antimicrobials were tested: erythromycin (ERY), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT), clindamycin (CLI), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), tetracycline (TET), rifampin (RIF) and linezolid (LNZ). The ceftiofur (FOX) was used to detect methicillin-resistance.

For urine isolates antimicrobials CLI and ERY were not evaluated because they were not used for the treatment of MRSA urinary tract infections.

These tests were in accordance with criteria established by the Clinical and Laboratory Standards Institute Standards (CLSI, 2010).

The identification of SCC*mec* typing of all MRSA isolates was performed by multiplex PCR assay as described elsewhere (MILHEIRIÇO; OLIVEIRA; DE LENCASTRE, 2007).

### **1.3. Genotyping**

The total DNA was extracted by a chemical method according to the procedures described in Sambrook and Russell (2001) the DNA was stored at -20°C until use. The quantity and purity of DNA obtained, quantification was performed at 260/280 nm using an automated plate reader (Synergy™ HT, Biotek).

The genetic diversity of the MRSA isolates was analyzed by PCR using RW3A (5'TCGCTCAAACAACGACACC3', DEL VECCHIO et al., 1995), JB1 (5' GATTTTATGGCCGTCCGC3', BEDENDO; PIGNATARI, 2000) and BOX A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3', VERSALOVIC et al., 1994) as described previously. These primers amplify repetitive DNA found in different regions of the genome bacterial species.

PCR products and molecular DNA weight marker X (0,07-12,2 kbp Roche®) were separated by electrophoresis in 2% agarose gel (Invitrogen®) at 75 volts and visualized on a UV transilluminator after staining with Gel Red (Biotium®).

### **1.4. Similarity profile analysis**

For cluster analysis were performed with BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.4.6) program, using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient (J) (SNEATH; SOKAL, 1973) with a tolerance of 3%.

### 1.5. Biofilm test in polystyrene surface

MRSA isolates were tested for biofilm production on polystyrene surface according to Stepanovic et al. (2007). MRSA BEC 9393 and culture medium alone were used as positive and negative control for the biofilm production, respectively. The biofilm was quantified at 570 nm using an automated plate reader (Synergy™ HT, Biotek).

The mean value of the optical density OD of the negative control (OD<sub>c</sub>) was used to compare with those obtained from the isolates (OD<sub>i</sub>). The OD<sub>i</sub> of each isolate was obtained by the mean minus OD<sub>c</sub>. The isolates were classified as no-biofilm-producer when OD<sub>i</sub> ≤ OD<sub>c</sub>; and as biofilm-producer when OD<sub>i</sub> > OD<sub>c</sub>.

### 1.6. Statistical analysis

Statistical differences among the results obtained were examined using Fisher method. Differences were considered significant at  $p < 0.05$  of the BioEstat version 5.0 software.

## 2. RESULTS

### 2.1. Species identification and antimicrobial susceptibility profile

All MRSA isolates of this study showed the presence of *coa* and *mecA* genes, FOX resistance, and LNZ susceptibility. Among the other antimicrobial agents tested, CIP (94.5%), ERY (94.1%) and CLI (92.2%) resistances were the most prevalent in these isolates. However the percentage of SXT (29.1%), RIF (23.6%) and TET (16.4%) resistances were lower than others antimicrobials.

Based on antimicrobial resistance profiles (number and types of antimicrobials), seven antibiotypes (A, B, C, D, E, F and G) were established for these isolates. The antibiotype A, harbored the more resistant (resistant to seven isolates antimicrobials) were observed in 14.5%, and G harbored the less resistant isolates (two antimicrobials) were observed in 3.7%. Uncharacteristic profiles that

were not grouped in none of seven antibiotypes were designated by the letter O (Table 1). Others antibiotypes and their percentage were determined: B (9.1%), C (5.5%), D (21.8%), E (16.4%), F (14.5%) and O (14.5%).

**Table 1** – Genotypic and phenotypic characteristics of MRSA isolated from sources of patients at the University Hospital of Londrina-PR: SCC*mec* types, antibiotypes, genotypes and biofilm production.

| MRSA    | SCC<br><i>mec</i> | Source                | Antibiotype | GENOTYPES |     |         |              | Biofilm<br>production |
|---------|-------------------|-----------------------|-------------|-----------|-----|---------|--------------|-----------------------|
|         |                   |                       |             | RW3A      | JB1 | BOX A1R | RW3A-<br>JB1 |                       |
| MRSA414 | I                 | Blood                 | B           | SI        | 2G  | 3I      | SI           | +                     |
| MRSA107 | I                 | Secretion             | B           | 1B        | 2B  | SI      | 4F           | +                     |
| MRSA126 | I                 | Secretion             | B           | 1B        | SI  | 3I      | 4D           | +                     |
| MRSA402 | I                 | Blood                 | C           | 1H        | SI  | 3I      | 4A           | +                     |
| MRSA309 | I                 | Tracheal<br>secretion | C           | 1F        | 2I  | 3F      | SI           | +                     |
| MRSA401 | I                 | Blood                 | D           | SI        | 2G  | 3F      | SI           | -                     |
| MRSA406 | I                 | Blood                 | D           | 1B        | 2E  | 3I      | 4D           | -                     |
| MRSA413 | I                 | Blood                 | D           | ∞         | 2K  | ∞       | 4K           | -                     |
| MRSA103 | I                 | Secretion             | D           | 1B        | SI  | SI      | 4G           | +                     |
| MRSA125 | I                 | Secretion             | D           | 1I        | 2K  | 3I      | 4K           | -                     |
| MRSA127 | I                 | Secretion             | D           | 1K        | SI  | 3I      | SI           | +                     |
| MRSA104 | I                 | Secretion             | D           | 1G        | 2F  | 3B      | 4C           | -                     |
| MRSA116 | I                 | Secretion             | D           | 1C        | 2F  | SI      | 4D           | -                     |
| MRSA121 | I                 | Secretion             | D           | 1C        | 2N  | SI      | SI           | -                     |
| MRSA403 | I                 | Blood                 | D           | 1H        | 2E  | 3E      | 4A           | -                     |
| MRSA123 | I                 | Secretion             | D           | SI        | 2L  | 3G      | SI           | +                     |
| MRSA404 | I                 | Sangue                | O           | 1F        | 2G  | 3D      | 4J           | -                     |
| MRSA117 | I                 | Secretion             | O           | 1C        | SI  | SI      | 4F           | -                     |
| MRSA203 | I                 | Urine                 | O           | 1H        | 2G  | 3G      | 4B           | +                     |
| MRSA120 | II                | Secretion             | A           | 1D        | SI  | SI      | 4H           | +                     |
| MRSA302 | II                | Tracheal<br>secretion | C           | SI        | SI  | 3I      | SI           | +                     |
| MRSA405 | II                | Blood                 | E           | 1J        | 2G  | 3H      | SI           | -                     |
| MRSA408 | II                | Blood                 | E           | 1B        | ∞   | 3D      | 4F           | -                     |
| MRSA415 | II                | Blood                 | E           | 1C        | 2M  | 3I      | SI           | -                     |
| MRSA409 | II                | Blood                 | E           | SI        | 2E  | 3D      | SI           | -                     |
| MRSA407 | II                | Blood                 | E           | 1F        | SI  | 3H      | 4J           | -                     |
| MRSA113 | II                | Secretion             | E           | 1B        | 2A  | 3A      | 4F           | -                     |
| MRSA114 | II                | Secretion             | E           | 1B        | SI  | 3A      | 4G           | -                     |
| MRSA118 | II                | Secretion             | E           | 1C        | SI  | SI      | 4E           | +                     |
| MRSA411 | II                | Blood                 | E           | 1I        | SI  | 3I      | SI           | -                     |

|         |     |                    |   |    |    |    |    |   |
|---------|-----|--------------------|---|----|----|----|----|---|
| MRSA412 | II  | Blood              | F | 1B | 2K | ∞  | SI | - |
| MRSA101 | II  | Secretion          | F | 1B | 2A | SI | 4G | + |
| MRSA105 | II  | Secretion          | F | 1G | 2A | 3A | 4C | + |
| MRSA106 | II  | Secretion          | F | SI | 2B | SI | SI | - |
| MRSA111 | II  | Secretion          | F | 1B | 2B | SI | 4F | - |
| MRSA124 | II  | Secretion          | F | 1K | 2A | 3G | SI | - |
| MRSA108 | II  | Secretion          | F | 1C | 2I | 3B | SI | - |
| MRSA307 | II  | Tracheal secretion | F | SI | 2G | 3G | 4J | + |
| MRSA304 | II  | Tracheal secretion | O | 1A | 2J | 3I | SI | + |
| MRSA301 | II  | Tracheal secretion | O | 1C | ∞  | 3I | 4D | + |
| MRSA202 | II  | Urine              | O | 1D | 2H | 3I | 4I | + |
| MRSA204 | II  | Urine              | O | 1J | 2N | 3I | SI | + |
| MRSA201 | II  | Urine              | O | 1I | SI | 3I | SI | + |
| MRSA122 | III | Secretion          | A | SI | 2L | 3C | SI | - |
| MRSA119 | III | Secretion          | A | 1D | 2H | SI | 4I | + |
| MRSA102 | III | Secretion          | A | 1D | 2A | SI | SI | + |
| MRSA109 | III | Secretion          | A | 1D | 2D | 3C | SI | + |
| MRSA410 | IV  | Blood              | G | SI | SI | 3I | SI | - |
| MRSA308 | IV  | Tracheal secretion | G | 1H | SI | 3G | 4A | + |
| MRSA112 | NT  | Secretion          | A | 1E | 2C | SI | 4H | + |
| MRSA303 | NT  | Tracheal secretion | A | 1C | 2J | 3I | 4E | + |
| MRSA306 | NT  | Tracheal secretion | A | SI | 2L | 3I | SI | + |
| MRSA110 | NT  | Secretion          | B | SI | 2D | SI | SI | + |
| MRSA115 | NT  | Secretion          | B | 1E | 2C | 3C | 4H | + |
| MRSA305 | NT  | Tracheal secretion | D | 1H | 2J | 3I | 4B | + |

NT: not typable

Antibiotype A resistant to CIP, CLI, ERY, GEN, SXT, TET; Antibiotype B resistant to CIP, CLI, ERY, GEN, SXT; Antibiotype C resistant to CIP, CLI, ERY, GEN, RIF; Antibiotype D resistant to CIP, CLI, ERY, GEN; Antibiotype E resistant to CIP, CLI, ERY, RIF; Antibiotype F resistant to CIP, CLI, ERY; Antibiotype G resistant to ERY; Antibiotype O resistant to CIP and some others.

RW3A genotype: 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 1K

JB1 genotype: 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N

BOX A1R genotype: 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G, 3H, 3I

RW3A-JB1 genotype: 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 4H, 4I, 4J, 4K

Single isolates (SI): unique clonal

Strains not amplified (∞)

Biofilm non-producing (-),

Biofilm producer (+).

## 2.2. PCR for *SCCmec* typing

The *SCCmec* type II was the most prevalent, being present in 24 isolates, followed by *SCCmec* type I, found in 19 isolates (Table 1). *SCCmec* type III and IV were found in 4 and 2 isolates, respectively (Table 1). Four isolates (MRSA 102, 109, 119 and 122) showed *SCCmec* type III, equal to MRSA BEC9393, and these secretion isolates showed A antibiotype, but only MRSA 122 not shown biofilm production.

## 2.3. Biofilm

Among the 55 isolates, 30 produced biofilm on polystyrene surface, and neither of 7 catheter isolates showed biofilm production (Table 1). Some isolates produced more biofilm than others, with results four times above ODC been stronger biofilm producing, MRSA112 isolate produced the largest amount biofilm (data not shown). All strains with antibiotype A (except one), B and C produced biofilm, however, only one strain with antibiotype E showed biofilm production. All *SCCmec* NT isolates produced biofilm (Table 1).

## 2.4. Analysis of genetic relatedness

The genetic relatedness between MRSA isolates was analyzed by three PCR-methods, in which primers are complementary to repetitive DNA in bacterial genome. By using cutoff value of 80% similarity, the primer JB1 showed the highest discriminatory power, as compared with the other primers (Figure 2). Fourteen genotypes were discriminated by JB1, eleven by RW3A (Figure 1) and nine by BOX A1R (Figure 3). Comparing primers RW3A and JB1 using the same cut off value were discriminated eleven genotypes and there were agreement for few isolates (Figure 4 and Table 1).

The genotypes obtained by RW3A primer were designated 1A-1K. Seven isolates were 100% similar; thirteen clonal groups with only one isolate showing similarity more than 80% were designed as single isolates (SI). The genotypes

obtained by JB1 were designated 2A-2N, eleven isolates were 100% similar; eighteen isolates were considered SI. The genotypes obtained by BOX A1R were designated by 3A-3I, thirty one strains were 100% similar; thirteen isolates were considered as SI. Associating RW3A-JB1 dendrogram the genotypes obtained were designated by 4A-4K, eleven isolates were 100% similar; eighteen isolates were considered SI. The most of the isolates within clonal group showed different phenotypes as well as types of *SCCmec*.

MRSA BEC 9393 strain showed 45% of similarity compared with 30 isolates using RW3A primer. Associating RW3A and JB1 primers, MRSA BEC 9393 and N315 strains showed 50% of similarity with 33 isolates.

There was no relationship to the three primers of genotyping groups with *SCCmec* types, whereas it could be inserting in different regions of DNA, not characterizing the presence of certain types of *SCCmec* as a specific clonal group.

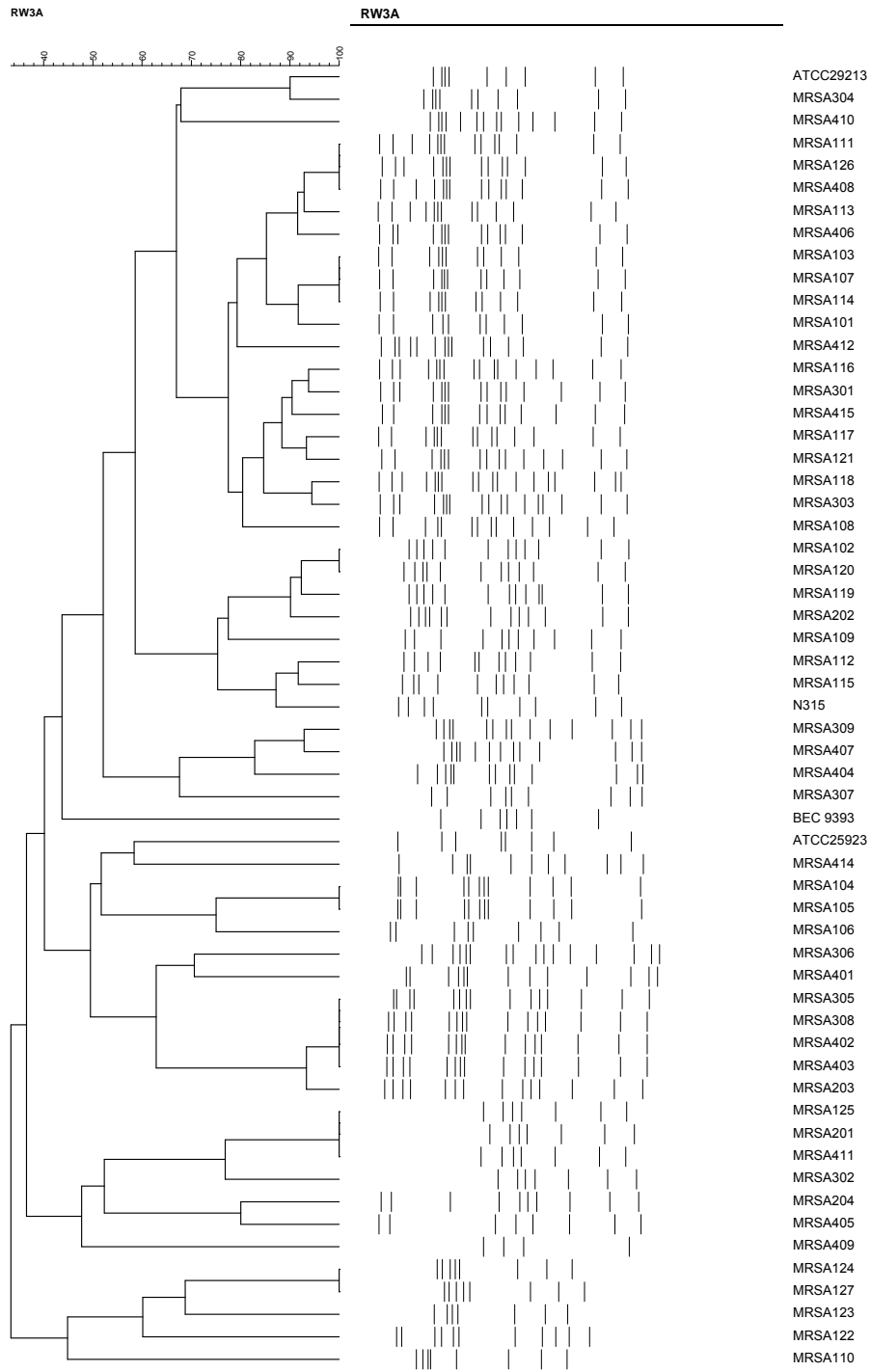
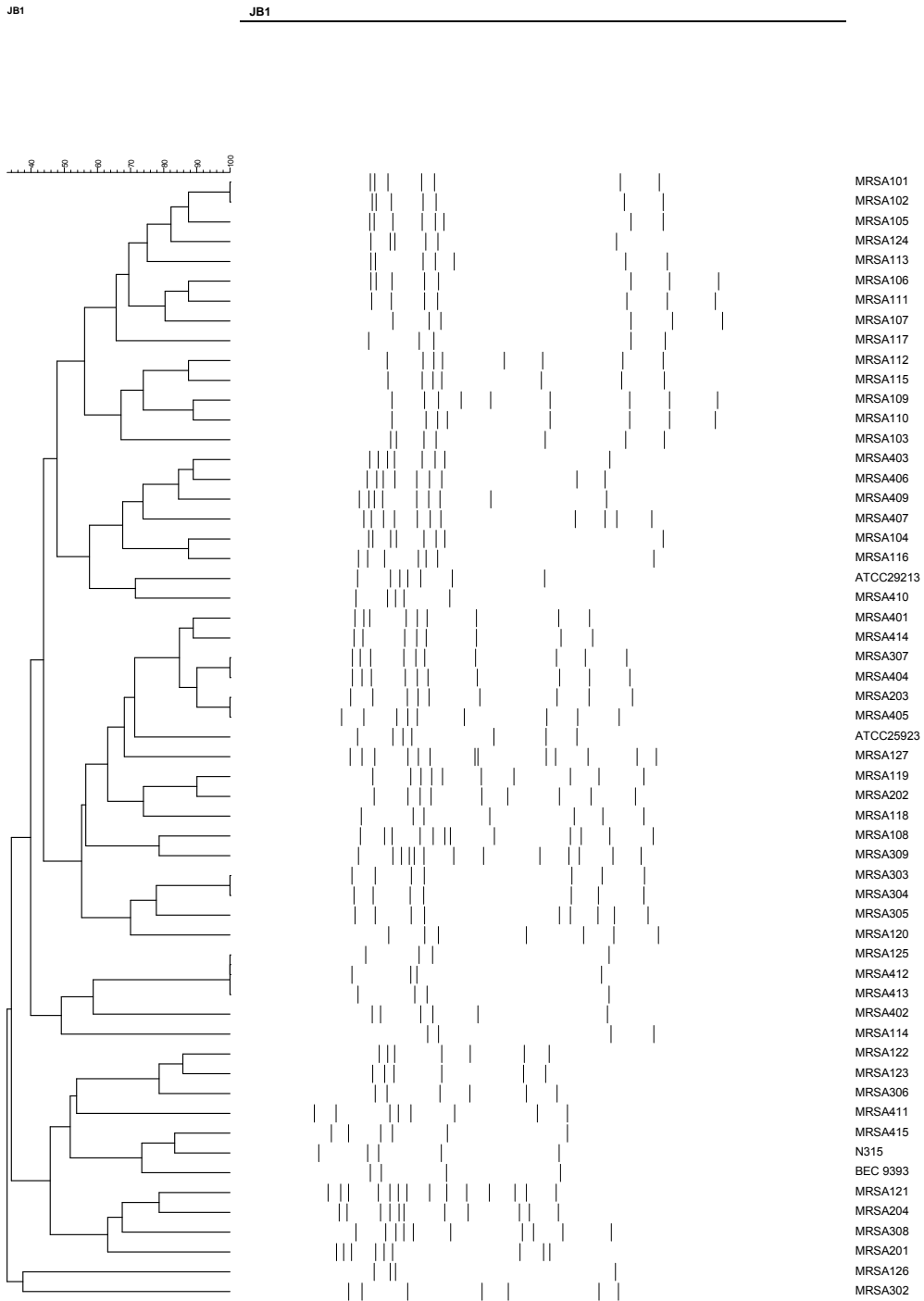


Figure 1 - Profile of similarity between MRSA isolates using RW3A primer.



**Figure 2** - Profile of similarity between MRSA isolates using JB1 primer.

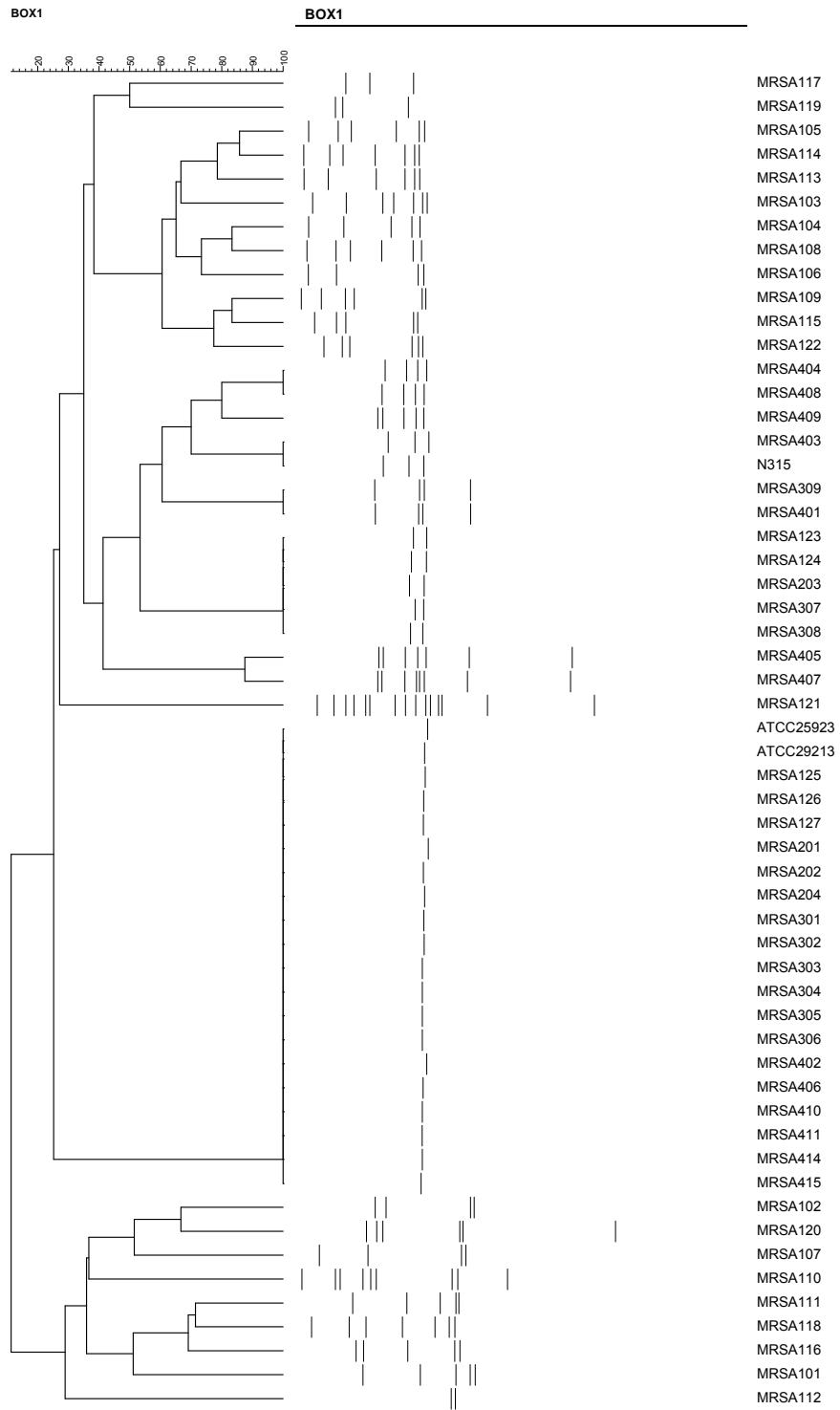
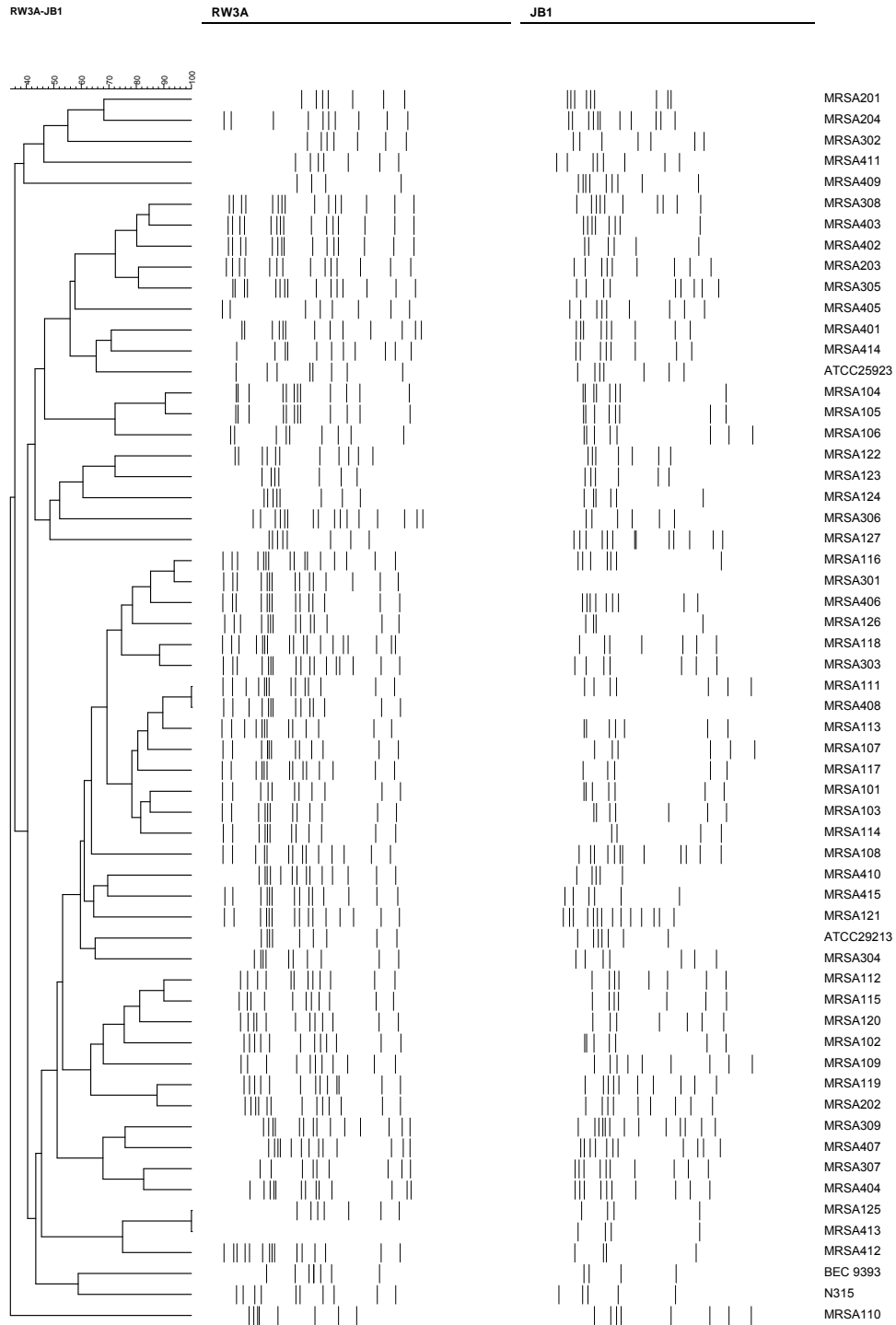


Figure 3 - Profile of similarity between MRSA isolates using BOX-A1R primer.



**Figure 4** - Profile of similarity between isolates of MRSA using combination of RW3A and JB1 primers.

### 3. DISCUSSION

Currently MRSA is considered the most common multi-drug resistant microorganism in hospitals (ROSENTHAL et al., 2012). In Brazil, the prevalence of MRSA isolates ranges from 40 to 80% (GALES et al., 2009).

A study conducted in the city of São Paulo show the contrast variation in susceptibility profile, which MRSA isolates showed CIP (42%), CLI (55%), ERY (15%), SXT (55%), GEN (37%), RIF (78%) and TET (64%) sensibility (PACHECO, 2008), different of our study, suggesting that the therapeutic approach in relation to the use of antimicrobials in hospitals may vary according to location (city, state and country).

Commonly MRSA is characterized by having multiple resistances to different antibiotics. Studies conducted by Sentry in the period 2005-2008 showed that MRSA strains were resistant to CIP (93%), CLI (89%), ERY (94%) and SXT (68%) and TET (47%), and high sensitivity to antimicrobial LNZ (99%) and vancomycin (100%) (GALES et al., 2009). In our study, we also found high resistance to CIP, CLI and ERY and sensibility to LNZ. On the other hand, resistance to SXT, RIF and TET was lower.

The Brazilian Endemic Clone (BEC) with *SCCmec* type III, has been shown to be the clone spread in Brazil, though this was not the kind of *SCCmec* more found in our isolates, *SCCmec* type II being the most prevalent in our study. Furthermore, analysis of DNA polymorphism performed in our study showed low genetic similarity (45%) of the strain BEC9393 with most of the strains studied. Researchers from southern Brazil analyzed isolates from a Hospital in Porto Alegre and found the presence of *SCCmec* type I, related to clone Cordoba/Chilean, warning of its possible spread replacing BEC (BECKER et al., 2012). A study with blood strains collected from patients at the Hospital das Clínicas in São Paulo, Brazil, showed *SCCmec* type II as the predominant (CAIAFFA-FILHO et al., 2013). Our results add these researches show that epidemiological studies involving clonality of MRSA, which is so common, because in recent years, new clones may arise, including different antimicrobial resistance profiles.

Two isolates (MRSA 410 and MRSA 308) showed *SCCmec* type IV. This type of *SCCmec* is not common in nosocomial infections, being characteristic of CA-MRSA. In addition, these isolates showed resistance to ERY. The presence of these

isolates in the hospital suggests that the spread of MRSA may occur between the two environments (community and hospital).

Most isolates showed ability to produce biofilm, which might represent greater difficulty in controlling MRSA infection. From six strains with *mecA* but different SCC*mec* types I to IV (NT), all produce biofilm, showing this important feature would be present in strains or new MRSA clones.

Evaluating the similarity between the isolates for the study of dendograms, to RW3A noted the presence of 17 isolates (30.9%), which showed 100% similarity and were distributed among different clonal groups. However the strains had not the same phenotypes being resistant to different classes of antimicrobials, according to another study (MOREIRA et al., 2012). This indicates the existence with identical genetic profiles, or similar, but we can not say that there is a clonal spread. For this, DNA polymorphism techniques have been recommended for identifying MRSA clones, which are extremely important in the epidemiology of the disease, and to determine the type of treatment of these infections. Del Velchio and collaborators (1995) using RW3A primer showed eight different fingerprint patterns in MRSA strains from different sources. Our study showed higher number of DNA bands (4 to 16 bands), and some isolates did not amplified high-intensity DNA fragment of approximately 325-bp. This difference of DNA fingerprint profile can be due different MRSA strains regarding geographic distribution and antibiotic treatment.

The isolates showed genotypic similarity profile over 35% for RW3A and JB1 primers, and a bit higher than that reported by other researchers that the profile similarity was 20% (MOREIRA et al., 2012), however for BOX A1R similarity is greater than 20%.

Genotypic analysis is an important tool for clinical practice since it provides data to better epidemiological and pathogenesis of infectious processes. PCR-based methods used in these studies have shown good results to evaluate the similarity between strains of *S. aureus* strains isolated from different locations (LIAO et al., 2006; MOREIRA et al., 2012). This method using RW3A primer had been shown interesting tool to separate the different genotypic profiles. In our study, the 1N clonal group (using RW3A primer) showed three isolates (75%) with SCC*mec* type III and identical characteristics (A antibiotic profile, secretion source and biofilm production). For JB1 and BOX primers, these three isolates showed different genotypes. Other isolate with SCC*mec* type III was designed as SI, and these isolate was not able to produce

biofilm in polystyrene surface. This phenotypic characteristic was important for discriminating of SCC*mec* type III isolates using RW3A primer.

The JB1 primer which has already been described for *Enterococcus faecium* (BEDENDO; PIGNATARI, 2000), exhibited desirable discriminatory power, suggesting that this primer could be used for this purpose, including phylogenetic analysis of MRSA isolates, from these two primers.

In our study, RW3A primer proved to be better, and the clonal groups became more distinct as the genotypic and phenotypic characteristics. A study concluded that the correlation between antimicrobial resistance and dissemination of clonal groups of *S. aureus* is an important tool to be held during outbreaks, or in endemic areas (GIAROLA et al., 2012). Another research emphasized the importance of genotypic strains characterization because antibiogram alone does not provide sufficient criteria for distinction (SANTOS; DARINI, 2002).

We recommend not to associate three primers, since in our study the result with primer BOX A1R did not show a good discriminatory power and ended up interfering in the results obtained by other primers.

Few studies have been performed using RW3A primer for *S. aureus* typing. Some researchers analyzed *S. aureus* susceptible and resistant to oxacillin and identified no correlation between resistance and percentage of similarity between strains. In our study there was no relationship of clonal groups with SCC*mec* types and resistance profile among the isolates.

The antimicrobial susceptibility tests provide information for routine surveillance, nevertheless genetic typing studies with greater power of discrimination must also be done. The correlation between clonality of strains and antimicrobial susceptibility profile is an important tool to assess the stage of outbreaks and characterize the epidemiology of hospital isolates. Our results showed that the technique of DNA polymorphism used in our study can provide important epidemiological information MRSA quickly and lower operating costs.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), who enabled the execution of this study; Diva S. Andrade by allowing the

analyzes in BioNumerics; and Erick Kenji Nishio for his assistance with the statistical analysis.

## REFERENCES

- BECKER, A. P. et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 140, n. 8, p. 1372-1375 2012.
- BEDENDO, J.; PIGNATARI, A. C. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 11, p. 1269-1274 2000.
- BENOIT, S. R. et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 1216-1223 2008.
- BERGLUND, C. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 10, p. 3512-3516 2008.
- CAIAFFA-FILHO, H. H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, n. 4, p. 518-520 2013.
- CARVALHO, K. S.; MAMIZUKA, E. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. 71-76 2010.
- CDC, C. F. D. C. A. P. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. . CDC 2013.
- CHONGTRAKOOL, P. et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1001-1012 2006.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute** 2010.
- DEL VECCHIO, V. G. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 8, p. 2141-2144 1995.
- DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, n. 3, p. 222-235 2007.
- ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 3, p. 1008-1015 2000.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Braz J Infect Dis**, v. 13, n. 2, p. 90-98 2009.

GIAROLA, L. B. et al. Carriage frequency, phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in northern parana. **Braz J Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 923-930 2012.

HIRAMATSU, K. et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 10, p. 486-493 2001.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1323-1336 2001.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 6, p. 1449-1458 1999.

ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 7, p. 2637-2651 2004.

IWG-SCC. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements. 2013. Disponível em: < <http://www.sccmec.org/> >. Acesso em: 20/01.

JOHNSON, A. P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. **J Antimicrob Chemother**, v. 66 Suppl 4, p. iv43-iv48 2011.

KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1225-1240 2001.

LI, S. et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 3046-3050 2011.

LIAO, R. S. et al. 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**, v. 44, n. 6, p. 2254-2257 2006.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16 Suppl 1, p. S3-10 2000.

LOWY, F. D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Where Is It Coming From and Where Is It Going? **JAMA Internal Medicine**, p. E1-E2 2013.

MA, X. X. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 4, p. 1147-1152 2002.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 1, p. 42-48 2007.

MIRANDA, A. G.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 12, p. 2752-2757 1991.

MOREIRA, A. C. M. G.; SANTOS, R. R.; BEDENDO, J. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes e membros da equipe de enfermagem. **Cogitare Enferm** v. 17, n. 3, p. 437-443 2012.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669 1999.

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRICO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 10, p. 3457-3459 2006.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 180-189 2002.

OLIVEIRA, G. A. et al. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 5, n. 4, p. 163-170 2001.

PACHECO, R. L. **Avaliação da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas**. 2008. 71 dissertação Medicina, USP  
São Paulo.

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 5, p. 396-407 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0879695773 (pbk. : set)  
0879695765 (set, cased).

SANTOS, B. M. O.; DARINI, A. L. C. Colonization by *Staphylococcus aureus* in healthy carriers from a nursery in a university hospital. **Medicina**, v. 35, n. 2, p. 160-172 2002.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification**. San Francisco, : W. H. Freeman, 1973. xv, 573 p. ISBN 0716706970.

SOARES, M. J. et al. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 8, p. 732-742 2001.

SONG, J. H. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 5, p. 1061-1069 2011.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899 2007.

TIWARI, H. K.; SAPKOTA, D.; SEN, M. R. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (coa) gene PCR as the gold standard. **Nepal Med Coll J**, v. 10, n. 2, p. 129-131 2008.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40 1994.

WENZEL, R.; HERRMANN, R. Repetitive DNA sequences in *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 17, p. 8337-8350 1988.

WIESER, M.; BUSSE, H. J. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50 Pt 3, p. 1087-1093 2000.

ZHANG, K. et al. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p. 531-540 2009.

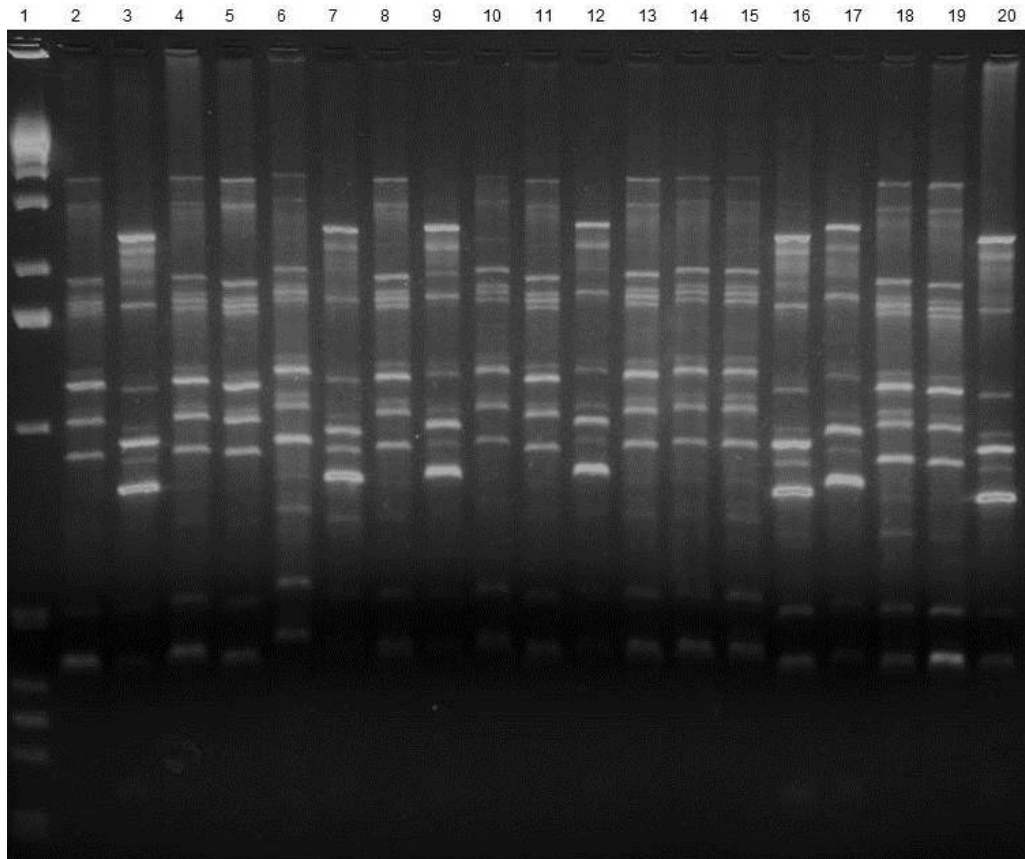
## **CONCLUSÃO**

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos fornecem informações para rotina de vigilância e estudos de tipagem genética com maior poder discriminatório também podem ser realizados. A correlação entre a clonalidade das cepas e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos é uma ferramenta importante para avaliar o estágio de surtos e caracterizar a epidemiologia de isolados hospitalares. Nossos resultados mostraram que a técnica de polimorfismo de DNA utilizado em nosso estudo pode fornecer informações importantes em relação à epidemiologia de MRSA, com maior rapidez e menores custos operacionais.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

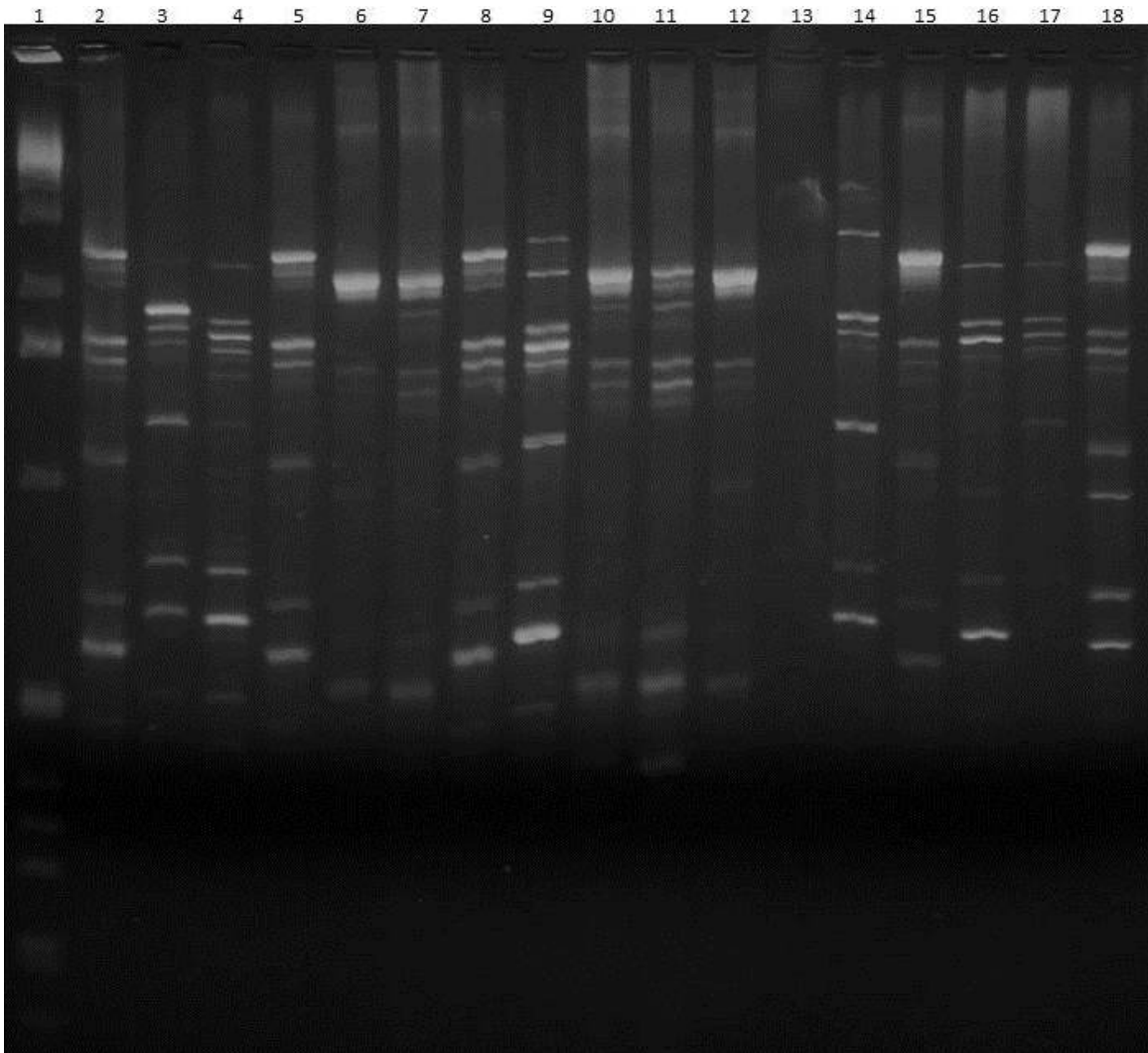
Gel de agarose com os perfis de similaridade entre as amostras, aplicando a técnica de PCR utilizando o primer RW3A



1- Molecular Marcker Roche X (0,07-12,2 kbp), 2- MRSA101, 3- MRSA102, 4- MRSA103, 5- MRSA107, 6- MRSA108, 7- MRSA109, 8- MRSA111, 9- MRSA112, 10- MRSA113, 11- MRSA114, 12- MRSA115, 13- MRSA116, 14- MRSA117, 15- MRSA118, 16- MRSA119, 17- MRSA120, 18- MRSA121, 19- MRSA126, 20- MRSA202

## ANEXO B

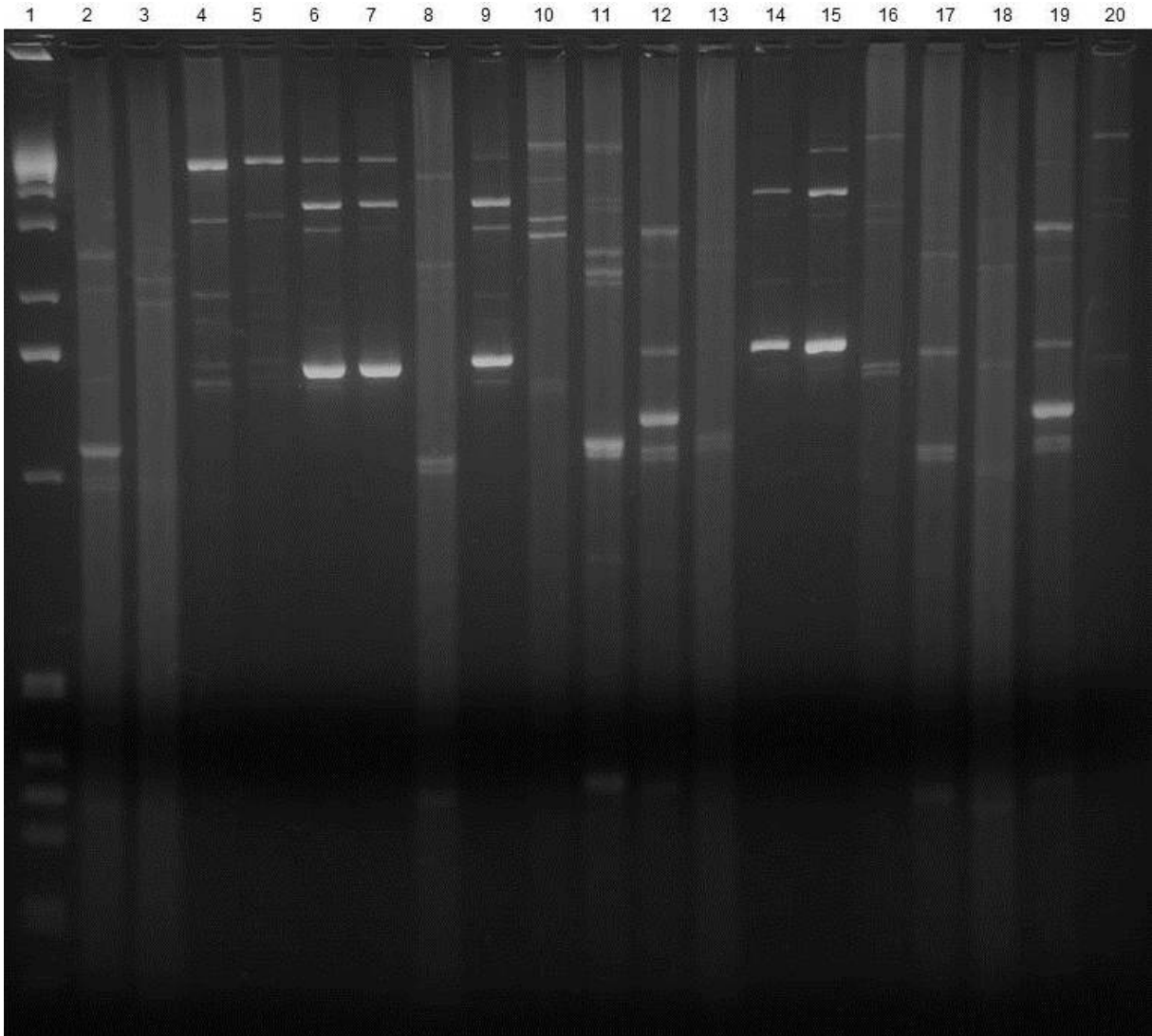
Gel de agarose com os perfis de similaridade entre as amostras, aplicando a técnica de PCR utilizando o primer JB1



1- Marcador Molecular Roche X (0,07-12,2 kbp), 2- MRSA307, 3- MRSA308, 4- MRSA309, 5- MRSA401, 6- MRSA402, 7- MRSA403, 8- MRSA404, 9- MRSA405, 10- MRSA406, 11- MRSA407, 12- MRSA409, 14- MRSA 411, 15- MRSA414, 16- ATCC25923, 17- ATCC 29213, 18- Controle interno

## ANEXO C

Gel de agarose com os perfis de similaridade entre as amostras, aplicando a técnica de PCR utilizando o primer BOX A1R.



1- Marcador Molecular Roche X (0,07-12,2 kbp), 2- MRSA101, 3-MRSA102, 4- MRSA103, 5- MRSA104, 6- MRSA105, 7- MRSA106, 8- MRSA107, 9- MRSA108, 10- MRSA109, 11- MRSA110, 12- MRSA111, 13- MRSA112, 14- MRSA113, 15- MRSA114, 16- MRSA115, 17- MRSA116, 18- MRSA117, 19- MRSA118, 20- MRSA119