

**GISELE CRISTIANE GENTILE CURY**

**UTILIZAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS POLIMÓRFICAS  
PARA O ESTUDO DE SIMILARIDADE DE  
ESTAFILOCOCOS RESISTENTES À OXACILINA,  
COM FINS EPIDEMIOLÓGICOS.**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2007**

**GISELE CRISTIANE GENTILE CURY**

**UTILIZAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS POLIMÓRFICAS  
PARA O ESTUDO DE SIMILARIDADE DE  
ESTAFILOCOCOS RESISTENTES À OXACILINA,  
COM FINS EPIDEMIOLÓGICOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Mestre em Clínica Médica, área de concentração em  
Ciências Básicas

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C949u Cury, Gisele Cristiane Gentile  
Utilização de regiões genômicas polimórficas para o estudo de similaridade de estafilococos resistentes à oxacilina, com fins epidemiológicos / Gisele Cristiane Gentile Cury. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estafilococos. 2. Resistência. 3. Oxacilina. I. Ramos, Marcelo de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : The use of polymorphic genomic regions for the similarity study of multi resistant *Staphylococcus* to oxacillin, with epidemiologist aims**

**Keywords:** • Staphylococcus

• Resistance

• Oxacilin

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**

**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos**

**Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber**

**Profa. Dra. Alexandra Costa Panunto**

**Data da defesa: 10 - 12 - 2007**

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof Dr. Marcelo de Carvalho Ramos**

---

---

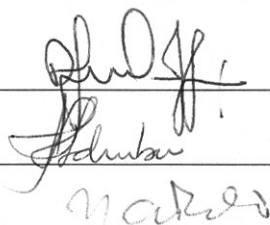
**Membros:**

---

1. Prof(a). Dr(a) .Alessandra Costa Panunto

2. Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninele Schreiber

3. Prof(a). Dr(a). Marcelo de Carvalho Ramos



The image shows three handwritten signatures in black ink, each corresponding to one of the members listed on the left. The first signature is for Alessandra Costa Panunto, the second for Angélica Zaninele Schreiber, and the third for Marcelo de Carvalho Ramos.

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 10/12/2007**

---

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Rui e Margarida, Homem e mulher de garra, determinação e sabedoria infinita. Ensinaram-me a amar o que tenho e o que sou, me ensinaram que ser feliz é ter realização plena em tudo o que se faz. Obrigada por estarem sempre ao meu lado...pois de nada adiantaria a vontade de ser, sem a possibilidade do fazer. Vocês me proporcionaram as condições para mais essa vitória.*

## AGRADECIMENTOS

---

**A Deus,**

Que no seu infinito conhecimento e sabedoria nos permitem desvendar e manipular parte de sua obra prima, além de nos habitar com mentes criadoras.

Ao **Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos**, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

Ao **Dr. Wanderley Dias da Silveira**, pelo empenho e colaboração.

Aos amigos do **Laboratório de Microbiologia (IB)**, pela amizade e colaboração.

Aos amigos do **Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular** pela colaboração e amizade.

À **Prof. Dra. Maria Cecília Barisson Villares**, pela colaboração e amizade.

Ao **Jofre**, meu marido, obrigada pela cumplicidade, paciência e amor.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

*"A vida não é um corredor reto e tranqüilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelo qual nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez emquando, presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós."*

**A. J. Cronén**

|                                                                                                            | PÁG.       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| RESUMO.....                                                                                                | <i>xi</i>  |
| ABSTRACT.....                                                                                              | <i>xiv</i> |
| 1- INTRODUÇÃO GERAL.....                                                                                   | 16         |
| 1.1- Importância das infecções estafilocócicas.....                                                        | 17         |
| 1.2- Técnicas de biologia molecular aplicadas à <i>Staphylococcus aureus</i> com fins epidemiológicos..... | 20         |
| 2- OBJETIVO.....                                                                                           | 23         |
| 3- CAPÍTULO.....                                                                                           | 25         |
| 3.1- Artigo (submetido).....                                                                               | 26         |
| 4- CONCLUSÃO GERAL.....                                                                                    | 43         |
| 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                         | 45         |
| 6- ANEXO.....                                                                                              | 53         |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

|                 |                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| BEC             | Clone Epidêmico Brasileiro                                     |
| <i>coa</i>      | Gene da coagulase                                              |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                                      |
| EMRSA           | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente epidêmicas  |
| Kb              | Kilopares de bases                                             |
| MRSA            | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente             |
| MSSA            | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-sensível               |
| PCR             | Reação em Cadeia de Polimerase                                 |
| PFGE ou CHEF    | Eletroforese em Campo Pulsado                                  |
| <i>S.aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i>                                   |
| SMRSA           | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente esporádicas |
| <i>spa</i>      | Gene da Proteína A                                             |

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                                     | PÁG. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Tabela 1-</b> Tabela representativa dos isolados com 100% de similaridade.....                                   | 40   |
| <b>Tabela 2-</b> Primers usados para amplificação dos genes: <i>spa</i> , <i>coa</i> e “housekeeping”. Anéxo 1..... | 54   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | PÁG. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1-</b> Eletroforese em gel de agarose (1.5%) dos fragmentos obtidos a partir da amplificação dos genes: <b>(1)</b> Marcador molecular 1Kb; <b>(A)</b> gene <i>spa</i> ,; <b>(B)</b> gene <i>coa</i> ; <b>(C)</b> digestão do gene <i>coa</i> com a enzima <i>Hae</i> III; <b>(D)</b> digestão do gene <i>coa</i> com a enzima <i>Alu</i> I.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 41   |
| <b>Figura 2-</b> Eletroforese em gel de agarose (1.5%) dos fragmentos obtidos a partir da amplificação dos genes “Housekeeping” e digestão com as enzimas: <b>(1)</b> Marcador molecular 1Kb; <b>(A)</b> locus <i>aroE</i> (enzima <i>CfoI</i> ); <b>(B)</b> locus <i>yqiL</i> (enzima <i>VspI</i> ); <b>(C)</b> locus <i>pta</i> (enzima <i>RsaI</i> ); <b>(D)</b> locus <i>yqiL</i> (enzima <i>DdeI</i> ); <b>(E)</b> locus <i>tpi</i> (enzima <i>BbuI</i> ); <b>(F)</b> locus <i>tpi</i> (enzima <i>MboI</i> ); <b>(G)</b> locus <i>arcC</i> (enzima <i>HinfI</i> ); <b>(H)</b> locus <i>aroE</i> (enzima <i>AluI</i> ); <b>(I)</b> locus <i>gmk</i> (enzima <i>CfoI</i> )..... | 41   |
| <b>Figura 3-</b> Dendrograma de similaridade genética dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 42   |

## RESUMO

A caracterização das bactérias em níveis sub-específicos, estabelecendo linhagens, tem grande aplicação no estudo das infecções que ocorrem dentro do ambiente hospitalar. Permitem fazer inferências sobre a extensão de surtos, rotas de transmissão e avaliação de medidas empregadas para o seu controle.

Os métodos de tipagem podem ser divididos em fenotípicos, quando se baseiam em características expressas pelo organismo, ou genotípicos, quando a comparação se dá pelo seu material genético, sendo os últimos menos sujeitos às pressões ambientais. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria bastante comum tanto no ambiente hospitalar, quanto na comunidade, sendo responsável por quadros clínicos de gravidade variável. A técnica considerada de escolha para genotipagem deste microorganismo é a Eletroforese em Campo Pulsado, (PFGE ou CHEF). Esse método exige equipamento de alto custo, é trabalhoso e fornece resultados somente após 5 ou 6 dias de trabalho. Porém, é um método de muita reprodutibilidade e altamente discriminatório.

Com o objetivo de avaliar a tipabilidade e poder discriminatório da tipagem de *Staphylococcus aureus* pela amplificação por PCR da região variável do gene Coagulase (*coa*), da região X do gene da Proteína A (*spa*) e da exploração de genes de “housekeeping”, desenvolveu-se o presente estudo. Foram analisadas 124 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, isoladas no período de setembro de 2002 a junho de 2005 pelo laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP e 26 amostras foram obtidas do banco de microrganismos do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto (FCMRP-USP). Foram também analisadas as cepas, 257A, 20COA e 256B, gentilmente cedidas pela Dra. Maria Clara Padovese (Padoveze et al., 2001) da Universidade Estadual de Campinas, as cepas BEC 9393 e HC562 cedidas pelo Dr. Agnes M. Figueiredo (Soares et al., 2001) da Universidade Federal do Rio de Janeiro para fins de comparação.

Os resultados obtidos indicam a existência de três conglomerados principais. Baseado no fato de que a distribuição dos isolados é bem característica, provavelmente, existem três linhagens principais. Quase todos os isolados obtidos

em Ribeirão Preto foram agrupados no conglomerado C, com poucos isolados no conglomerado A (4 casos) e B (1 caso). Essa distribuição também acusa a existência de uma cepa original diferente que sofreu variação genética independente. Ainda, a presença de isolados de uma cidade (Ribeirão Preto) com proximidade genética aos isolados de outra cidade (Campinas) reflete a provável disseminação desses isolados com o trânsito de pacientes entre esses locais. Os isolados representativos do Clone Epidêmico Brasileiro foram caracterizados como os isolados do conglomerado A. Nossos resultados ainda indicam uma possível maior variabilidade, entre as cepas do clone brasileiro.

## **ABSTRACT**

One hundred and fifty-four methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains have been isolated from patients attended in tertiary care hospitals in two metropolitan areas (Campinas City and Ribeirão Preto City) in the southeast region of Brazil and analyzed through PCR-based techniques [(PCR amplification of *spA*, *coa*, and housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*)] and further restriction fragment typing of *coa* and housekeeping genes. The heterogeneity of *spA* gene was determined directly by agarose gel electrophoresis migration. The results obtained indicate the existence of three (A, B, C) main strain clusters. Since the strain distribution in these three clusters is much characteristic, it denotes the existence of three main clones. All strains isolated in Campinas were grouped in clusters A and B, while most of the strains isolated in Ribeirão Preto were grouped in cluster C, with a few strains in cluster A (4) and B (1). This distribution denotes the existence of different founder strains that undergo independent genetic variability. The presence of strains of one city (Ribeirão Preto) with genetic proximity to strains of another city (Campinas) may reflect the possible spread of strains with the acquisition of the infection in one city and the medical treatment in the other one. The strains considered representative of the Brazilian Epidemic Clone (BEC) were categorized as clone A. These results indicate a possible variability higher among Brazilian MRSA strains than currently described.

## **1- INTRODUÇÃO GERAL**

## 1.1- Importância das infecções estafilocócicas

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são conhecidas há muito tempo. Em 1880 e 1882, \*OGSTON descreveu os aspectos clínicos da doença estafilocócica, comentando a capacidade desta bactéria promover septicemias e induzir a formação de abscessos. As infecções estafilocócicas são bastante comuns tanto na comunidade, quanto no ambiente hospitalar. Seu tratamento tornou-se mais difícil em razão do aparecimento de cepas resistentes a antimicrobianos.

O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram positivo, com diâmetro de 0,7 a 1,2 µm, que pode ser encontrado isolado, aos pares, em tétrades e agrupado, formando cadeias curtas ou cachos. Pertence à família *Micrococcaceae*, pode ser aeróbio ou anaeróbio facultativo, é imóvel e não esporulado (Kloods e Bannerman, 1999).

Em meios sólidos, as colônias de *S. aureus* são bem definidas, convexas, lisas e com diâmetro de 6 a 8 mm. Podem ter coloração amarelada, cor de ouro, devido a produção de carotenóides, daí a sua denominação. A produção de pigmentos pode ser intensificada por incubação em temperatura ambiente por 24 a 48 horas (Waldvogel, et al., 1995; Kloods e Bannerman, 1999). A confirmação da espécie se faz por provas bioquímicas, como a Catalase e a Coagulase sendo esta última utilizada para diferenciá-lo dos demais membros do gênero *Staphylococcus*, que não são capazes de promover a coagulação do plasma sanguíneo.

A espécie humana é um reservatório natural dessa bactéria. Ela pode colonizar e causar infecções tanto em pacientes hospitalizados, quanto em indivíduos da comunidade. Estima-se que de 30 a 50% da população adulta possa albergar o *S. aureus* em narinas anteriores, nasofaringe e em áreas úmidas e pilificadas do corpo (Lowy, 1998). Dessa forma, esse microrganismo é capaz de estabelecer uma relação simbiótica com o homem, o que favorece sua

---

\* OGSTON., Apud LOWY, FD, 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Méd, 339(8):520-32.

manutenção no meio ambiente. Em momentos onde as barreiras de proteção naturais são quebradas (lesão de pele, trauma, implantação de dispositivos médicos e outros), eles podem penetrar nos tecidos e órgãos profundos, causando doenças.

A transmissão por contato direto, pessoa a pessoa, parece ser a principal via de transmissão da doença estafilocócica dentro do ambiente hospitalar. O *Staphylococcus aureus* pode até ser isolado em materiais inanimados como mobiliário e superfícies do ambiente hospitalar, mas o contato pessoa a pessoa é passo fundamental para sua transmissão.

Antes do desenvolvimento da terapia antimicrobiana, a letalidade dos casos de bacteremia por *S. aureus* girava em torno de 90% (Maranan et al., 1997). Em 1940, com o advento da penicilina G, a história clínica da infecção estafilocócica pôde ser alterada. Houve, porém, o rápido aparecimento de cepas resistentes à penicilina no meio hospitalar e na comunidade.

O mecanismo de resistência à penicilina é a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que inativa o antimicrobiano, impedindo sua ação (Waldvogel et al., 1995).

Deu-se, então, o desenvolvimento de penicilinas que são resistentes à ação de  $\beta$ -lactamases. Em 1960, passa a ser disponível a oxacilina e a meticilina. Ainda na década de 60, começa a ocorrer a identificação de isolados resistentes a estes compostos. Esse fenômeno ocorreu inicialmente nos hospitais, onde houve a rápida disseminação dessa cepa, que passa a ser conhecida como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, SAMR, ou *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, SARO. Este fenômeno também pôde ser observado na comunidade (Shopsin et al., 2001). A resistência à oxacilina é relacionada à expressão do gene *mecA*, que provoca alteração no sítio de ação do antibiótico, dessa forma comprometendo sua eficácia. Como alternativa terapêutica para as cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina, surgiram os antibióticos glicopeptídeos: vancomicina e teicoplanina (Kloods & Bannerman, 1999)

Algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* – MRSA, que são consideradas epidêmicas (EMRSA) são capazes de se disseminar rapidamente entre pacientes e, uma vez introduzidas em dada instituição hospitalar, são de difícil controle e erradicação, tornando-se endêmicas ou epidêmicas. Outras linhagens resistentes à meticilina, que não são capazes de se disseminar, são denominadas MRSA esporádicas (SMRSA) segundo Hoefnagels-Schuermans *et al.* (1997).

Em ambientes hospitalares, podem existir as linhagens epidêmicas e esporádicas (EMRSA e SMRSA). As linhagens EMRSA são adquiridas, principalmente, por pacientes internados em unidades de cuidados intensivos. As linhagens SMRSA, por outro lado, são introduzidas no ambiente hospitalar por pacientes internados recebendo tratamento prolongado (Hoefnagels-Schuermans *et al.*, 1997).

No início dos anos 80, uma única linhagem de MRSA causou um surto epidêmico em diversos hospitais da Inglaterra e País de Gales, (Townsend *et al.*, 1987). Dez anos depois, Kerr *et al.* (1990) através de técnicas como: fagotipagem e testes de susceptibilidade a antibióticos, demonstraram a existência de outras 14 linhagens de MRSA epidêmicas que haviam afetado mais um hospital. Nessa mesma época, Struelens *et al.* (1992) demonstraram por macrorrestrição de DNA e eletroforese em campo pulsado (PFGE), que uma mesma linhagem causou surtos em pelo menos três hospitais diferentes na Bélgica.

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) estão aumentando no mundo todo. Com o aumento do interesse na resistência antimicrobiana, existem agora vários grandes grupos formados para gerenciar a resistência antimicrobiana com bases nacionais e internacionais, como: o National Nosocomial Infection Surveillance System, o Projeto Icare, o Sentry e o Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica. Jarvis *et al.* (1991); Edmond *et al.* (1999); Fridkin *et al.* (1999); Diekema *et al.* (1999); Sahm *et al.* (1999); Felmingham *et al.* (2000).

Na cidade de Nova York, linhagens MRSA são responsáveis por aproximadamente 29% das infecções hospitalares, sendo que 50% dessas infecções causam o óbito dos pacientes. (Shopsin et al., 1999).

No Brasil, dados do programa Sentry, mostram que o *S. aureus* é a bactéria mais freqüentemente isolada de pacientes hospitalizados, sendo a principal bactéria encontrada em infecções cirúrgicas e na corrente sanguínea, além de ser a segunda mais encontrada em infecções respiratórias (Sader et al., 2001).

Devido ao grande poder de disseminação de linhagens de MRSA, a implantação de um efetivo programa de monitoramento para identificação e controle de epidemias têm sido necessário (Meier et al., 1996).

## **1.2- Técnicas de biologia molecular aplicadas à *Staphylococcus aureus* com fins epidemiológicos.**

Diversas técnicas de genotipagem podem ser empregadas para a análise epidemiológica em casos de suspeitas de surtos de infecções provocadas pelo *S aureus*. Todas essas técnicas baseiam-se na existência de polimorfismos em vários trechos do cromossomo bacteriano. Alguns desses polimorfismos ocorrem por inserção ou deleção de trechos de DNA, ao invés de trocas de nucleotídeos. Uma classe especial de polimorfismo por inserção/deleção, descrita por Frenay et al. (1994), consiste numa repetição de trechos de sequência conhecida na região X do gene da Proteína A (*spa*).

O número dessas repetições é variável em até 24 pb (*variable number of tandem repeats*, VNTR), portanto, o tamanho de todo o trecho é proporcional à quantidade de repetições existentes. Pode-se, então, estimar o número de alelos através da amplificação de todo o trecho e estimar o seu tamanho através de eletroforese e análise computacional. Esses polimorfismos podem caracterizar linhagens epidêmicas e não epidêmicas (esporádicas), já que são documentadamente estáveis para fins de análises genotípica.

Os estudos de Tang et al. (2000) indicam que a organização do gene *spa* é bastante estável entre linhagens MRSA epidemiologicamente relacionadas, coletadas num período de 2 anos. A variabilidade e estabilidade desse gene indicam que a análise de sua seqüência poderia ser usada como um sistema alternativo para a tipagem molecular. São necessárias análises genotípicas adicionais para maximizar a resolução, pois o poder discriminatório de um único sítio polimórfico é, normalmente, limitado. Linhagens com seqüências *spa* diferentes não são geneticamente relacionadas, entretanto o contrário pode não ser verdadeiro, ou seja, se as linhagens possuem seqüências idênticas, não significa que elas sejam relacionadas epidemiologicamente devido ao baixo poder discriminatório.

Frenay et al., (1994) tentaram discriminar as linhagens EMRSA das SMRSA com base no polimorfismo desta região. Estes autores demonstraram que linhagens com mais de sete repetições na região X desta proteína, tendiam a ser epidêmicas, enquanto que, a presença de sete ou menos repetições, era indicativo de linhagens MRSA não epidêmicas.

Recentemente, melhores resultados têm sido obtidos com o seqüenciamento dessa região, já que o cálculo de tamanho é difícil de ser feito e pode ocasionar erros (Shopsin et al., 1999).

O gene produtor da coagulase, uma constituinte natural do *S. aureus* e que é um importante fator de virulência, pode também ser usado para a caracterização genômica de isolados, com fins epidemiológicos. Existem regiões variáveis em trechos desse gene que podem ser explorados através de técnicas de amplificação e restrição (RFLP).

Goh et al. (1992) relacionaram, com sucesso, linhagens de MRSA, através da amplificação, por PCR, da região variável do gene da coagulase (*coa*), seguida de restrição por *Alu* I, *Hae* III e análise por RFLP, fazendo com que as variações nas seqüências dos genes da coagulase (*coa*) pudessem ser Utilizadas nos estudos de tipagem molecular de *S. aureus*. Estes estudos demonstraram

haver boa correlação com a caracterização através de PFGE (Hookey et al, 1998). Numerosas formas alélicas têm sido descritas para o gene *coa*, devido às variações na seqüência 3' final

Van Wamel et al. (1995) tentaram diferenciar EMRSA de SMRSA, baseando-se na expressão de proteínas com capacidade de se ligarem à matriz extracelular, tais como: as fibronectinas, vitronectinas e Fragmentos Fc de imunoglobulina G.

Dessa maneira, a utilização da técnica de PCR, para amplificação de determinados trechos de genes de *S. aureus*, como por exemplo, *coa* e *spa*, seguida ou não de restrição e seqüenciamento pode ser utilizada para o estudo de linhagens de *S. aureus* meticilina-resistentes isolados no ambiente hospitalar, podendo inclusive, serem comparadas com relação ao seu poder de discriminação entre linhagens MRSA epidêmicas e esporádicas, com a técnica considerada padrão (PFGE). Além disso, a rápida obtenção de resultados e confiabilidade dos mesmos pode fazer com que essas técnicas substituam o PFGE.

Os genes de “Housekeeping”, ou genes Constitutivos, se expressam em todas as células do organismo, estão sempre em atividade e codificam proteínas essenciais, podendo ser uma ferramenta para o estudo de *S. aureus* (Diep et al., 2003). Nesse estudo, foi usada uma combinação de técnicas de PCR (amplificação de trechos dos genes *spa*, *coa* e genes de “housekeeping” (*arcC*, *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*), seguida de restrição dos fragmentos btidos dos genes *coa* e “housekeeping”). Para os fragmentos do gene *spa*, através da migração por eletroforese em gel de agarose, foram determinados os alelos correspondentes ao número de repetições da seqüência em “tandem”.

## **2- OBJETIVO**

- Determinar, com fins epidemiológicos, o poder discriminatório das seguintes técnicas de genotipagem combinadas: amplificação de trecho do gene *coa*, seguido de restrição por *Alu* I e *Hae* III; amplificação e determinação do tamanho do fragmento amplificado do gene *spa* e amplificação e restrição de genes de “housekeeping” (*arcC*, *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina.

### **3- CAPÍTULO**

### 3.1- ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

#### **PCR-typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in two metropolitan areas of São Paulo State, Southeast Brazil.**

Submission: Diagnostic Microbiology and Infect Disease

Gisele Gentile Cury<sup>b</sup>, Cristiane Mobilon<sup>a</sup>, Eliana Guedes Stehling<sup>a</sup>, Marcelo Lancellotti<sup>a</sup>, Marcelo de Carvalho Ramos<sup>b</sup>, Roberto Martinez<sup>c</sup>, Marcelo Brocchi, Wanderley Dias da Silveira<sup>a\*</sup>

(a) Department of Microbiology and Immunology, Biology Institute, Campinas State University, Campinas (Unicamp), SP, Brazil. (wds@unicamp.br).

(b) Department of Internal Medicine, School of Medicine, Unicamp, (mdcr@unicamp.br).

(c) Department of Internal Medicine; School of Medicine; São Paulo State University at Ribeirão Preto-USP; CEP14049-900; Ribeirão Preto; SP. (rmartine@fmrp.usp.br).

Department of Microbiology and Immunology

Biology Institute

Campinas State University – UNICAMP

Rua Monteiro Lobato, s/n

PO BOX 6109

CEP 13083-862 - Campinas - SP- Brazil,

Phone: +55 (19) 3788-6272

E-mail: wds@unicamp.br

Running title: PCR typing of *Staphylococcus aureus* strains.

## Abstract

One hundred and fifty-four methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains have been isolated from patients attended in tertiary care hospitals in two metropolitan areas (Campinas City and Ribeirão Preto City) in the southeast region of Brazil and analyzed through PCR-based techniques [(PCR amplification of *spA*, *coa*, and housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*)] and further restriction fragment typing of *coa* and housekeeping genes. The heterogeneity of *spA* gene was determined directly by agarose gel electrophoresis migration. The results obtained indicate the existence of three (A, B, C) main strain clusters. Since the strain distribution in these three clusters is much characteristic, it denotes the existence of three main clones. All strains isolated in Campinas were grouped in clusters A and B, while most of the strains isolated in Ribeirão Preto were grouped in cluster C, with a few strains in cluster A (4) and B (1). This distribution denotes the existence of different founder strains that undergo independent genetic variability. The presence of strains of one city (Ribeirão Preto) with genetic proximity to strains of another city (Campinas) may reflect the possible spread of strains with the acquisition of the infection in one city and the medical treatment in the other one. The strains considered representative of the Brazilian Epidemic Clone (BEC) were categorized as clone A. These results indicate a possible variability higher among Brazilian MRSA strains than currently described.

## Introduction

Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) have become some of the most significant nosocomial pathogens worldwide, being capable of causing a wide range of hospital infections and clinical syndromes associated with severe diseases, including bacteremia, pneumonia, endocarditis, septic arthritis, osteomyelitis, and deep abscess formation (Ayliffe, 1997). As MRSA strains can disseminate very rapidly, it is necessary to implement effective monitoring programs for the identification and control of epidemic strains (Meier et al., 1996).

Phenotype and genotype markers may be used to identify epidemic MRSA. The principal disadvantage of phenotype methods is in the variability of strain characteristics, which may be increased either by horizontal transmission or by the loss of extra chromosomal genetic elements (Blanc et al., 1996). The introduction of DNA analysis-based genotyping methods has significantly increased the resolution of epidemiologic typing (Na'was et al., 1998). Among these methods, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has become the most reliable MRSA typing method and has been used to identify outbreak strains (Peacock et al., 2002; Shopsin et al., 1999, Tenover et al., 1995). Alternatively to PFGE, a difficult and expensive technique, other molecular techniques such as multilocus sequence typing (MLST) and *spA* and *coa* typing have been successfully used to differentiate between MRSA strains (Enright et al., 2000). Previous PFGE studies have documented the emergence of two particularly widely disseminated multi-resistant MRSA clones. One of these, the Iberian MRSA, first identified as the dominant clone in a major MRSA disease outbreak in a hospital in Spain in 1989 (Dominguez et al., 1994), was subsequently detected in at least eight Portuguese hospitals (Aires de Souza et al., 1996) as well as in hospitals in Western Scotland, United Kingdom, Italy, Belgium, and Germany (Mato et al., 1998), and in one hospital in the USA (Rubin et al., 1999). A second multi-resistant clone (Brazilian Epidemic clone - BEC) was shown to be widely spread in Brazilian hospitals several thousands of kilometers apart (Teixeira et al., 1995) and later it

was also associated with infections in Portugal, Argentina, Uruguay, Czech Republic, and Canada (Melter et al., 1999; Sanches et al., 1995; Coimbra et al., 2000; de Sousa et al., 1998). Several other studies in Brazil (dos Santos Soares et al., 2000; Soares et al., 2001; Branchini et al., 1993) accomplished with Brazilian MRSA isolates indicated a low variability between the analyzed strains by PFGE.

In this work, it was used a combination of PCR-based techniques [(PCR amplification of *spA* and *coa* genes and housekeeping genes (*arcC* , *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqjL*)] with further restriction and fragment typing of the *coa* gene and housekeeping genes, plus the direct determination of the heterogeneity of the *spA* gene by agarose gel electrophoresis migration, to assess the existing genomic variability of 154 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in two metropolitan areas in Southeast Brazil. The strains were isolated from patients attended in two tertiary care hospitals, at the Medical School Hospital of Campinas State University (UNICAMP) in Campinas City and the Medical School Hospital of São Paulo University in Ribeirão Preto City (FCMRP-USP), both located in São Paulo State. Because of the large number of towns served by these hospitals, the isolated strains may be representative of regional strains. Besides that, as these two industrial and agricultural regional centers attract migrants from other regions of Brazil, the genetic variability possibly detected in the strains herein studied might reflect that existing in Brazil.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Isolates**

Isolates were obtained from patients attended in two tertiary cares, Medical School Hospitals located in two metropolitan areas of São Paulo State, Southeast Brazil between 2002 and 2005.. In the Medical School Hospital of Campinas State University, it was obtained 124 isolates, and in the Medical School Hospital of São Paulo University in Ribeirão Preto City (FCMRP-USP), it was obtained 26 isolates. Four strains (257A, 20COA, 256B, and 24COA) also isolated

in the Medical School Hospital of Campinas State University were a gift from Dr. Maria Clara Padoveze (Padoveze et al., 2001). As control strains and for comparison sake in the clustering analysis, another 02 isolates (BEC 9393; HC 562) to Dr. Agnes M. Figueiredo (Soares et al., 2001) from Universidade Federal do Rio de Janeiro were used.

## **2.2 Genomic DNA Extraction**

For genomic DNA extraction, the MRSA strains were grown overnight in LB medium (Sambrook et al., 1989) at 37 °C and total DNA was extracted as described by Ausubel et al., 1988.

## **2.3. PCR amplification and analysis of the polymorphism of the *coa* gene**

The amplification of DNA fragments of the *coa* gene and further restriction with endonucleases and agarose gel electrophoresis followed the protocol described by Montesinos et al., 2002.

## **2.4. PCR amplification and analysis of the polymorphism of *spA* gene**

The amplification of DNA fragments of the *spA* gene was accomplished as described by Koreen et al., 2004. The polymorphisms of the fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis as described by Koreen et al., 2004.

## **2.5. PCR amplification of housekeeping genes and polymorphism analysis**

Housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) amplification by PCR and amplified fragment restriction with endonucleases were performed as described by Diep et al., 2003. The resulting fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis as described by Sambrook et al., 1989.

## 2.6. Genomic similarity and statistical analysis

The genomic similarity between strains was assessed throughout the construction of a similarity Dendrograma generated by the NTSys software (UPGMA algorithm) using the combination of all generated fragments obtained by all PCR-based techniques (Rohlf, 1997).

## 3. Results

The similarity dendrogram (Figure 3) obtained using the joint results of PCR amplification of *spA* (Figure 1), and PCR and restriction of *coa* (Figure 1) and housekeeping genes (Figure 2) for 154 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates demonstrated the existence of three main clusters (A, B, and C) with low identity between them, approximately 15% between clusters A and B and C, and 30% between clusters A and B (Figure 3). Clusters A, B, and C contained 45 (29.22%), 88 (57.14%), and 21 (13.64%) of the isolates, respectively (Figure 3, Table 1). Clusters

A and B contained all the strains (n= 128; 100%) isolated in the metropolitan area of Campinas City and five (19.23%) of the strains isolated in the metropolitan area of Ribeirão Preto (strains 1RP, 2RP, 77RP, 79RP, 95RP). On the other hand, cluster C contained most (n=21; 80.77%) of the strains isolated in Ribeirão Preto City.

In cluster A (n=45), only 09 strains were genetically identical. This clone is represented by strain 7 (Figure 3) and includes strains 14, 35, 72, 131, 157, and 185. All the other strains grouped in this cluster had varying similarity among them. Strain BEC 9393, representative of the Brazilian Epidemic Clone, was assigned to cluster A, with just 58% of similarity with the strains within the same cluster, but with a higher similarity with strains 257A, 24COA, and 256B, all isolated in the Medical School Hospital of Campinas State University. In addition, four strains isolated in the metropolitan area of Ribeirão Preto, 2RP, 77RP, 79RP, 95RP, were

assigned to cluster A. Three of these strains (2RP, 77RP, 79RP) were grouped close together, with approximately 75% similarity.

Cluster B (Figure 3) (n=88) presented nine identical clones represented by strains 4, 5, 6, 9, 10, 12, 106, 162, and 180 (Table 1). From all cluster B strains, only one (1RP) was isolated in metropolitan Ribeirão Preto. All cluster C strains (n= 21) were isolated in metropolitan Ribeirão Preto.

#### 4. Discussion

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has emerged and spread globally over the years since the first clinical use of the antibiotic methicillin (Coimbra et al., 2000). The study of these MRSA isolates by various chromosomal typing techniques has demonstrated the predominance of some MSRA clones. One of these clones is the Brazilian Epidemic Clone (BEC), which is believed to have disseminated from North to

South Brazil (Teixeira et al., 1995; dos Santos Soares et al., 2000) and is cited as a reference among other MRSA clones (de Souza et al., 1998). BEC isolates have also been detected in other countries, including Argentina, Uruguay, Paraguay, Chile, Portugal, Italy, and the Czech Republic (Oliveira et al., 1998; Campanile et al., 2001; de Souza et al., 2003; Melter et al., 1999).

In this work, the genomic variability of 154 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in two metropolitan areas of Southeast Brazil 250 Km apart was investigated. Since both metropolitan areas are industrial and agricultural centers and migration poles for other regions of Brazil, the variability detected among the herein studied strains should reflect that of other regions and therefore demonstrate the possible existence of other yet undescribed clone(s).

Although PFGE is considered to be the most reliable technique for the study of genomic variability of MRSA strains (Diep et al., 2003), it is time consuming, difficult to accomplish, and expensive and techniques such as PCR-rybotyping (Oliveira and Ramos, 2002) and Restriction Enzyme Analyses of Plasmid DNA (REAP) (Branchini et al., 1993) might show a smaller genetic variability for the studied strains than the actual one. In this way, to assess the polymorphism of these MRSA strains, we used a combination of PCR-amplified fragments [*spA* (Koreen et al. (2004), *coa* (Montesinos et al., 2002) and housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) (Diep et al., 2003; Enright et al., 2000)] with further RFLP analysis.

The results herein obtained indicate the existence of three main strain clusters in these two metropolitan areas. Since the distribution of the strains in these three clusters is very characteristic, it denotes the existence of three main clones. Although the first clone (A) does not have most of the strains, it contains the representative BEC strain (BEC9393) and strain HC562, which were previously studied (Santos-Soares et al., 2000). Clone A also contains four strains that were isolated in metropolitan Ribeirão Preto.

The second clone (B) comprises most of the strains, and with the exception of only one strain, (1RP), it contains only strains isolated in the Ribeirão Preto area. This clone has a higher similarity with clone A than with clone C, which indicates a close ancestral for these two clones.

The genetic proximity of the strains isolated in two different geographic areas might be due to the acquisition of the infection in a geographic area and the outcome and treatment of the disease in another one, with the possible spread of strains between cities and regions. Since patients' profiles are not available, this theory has to be established yet. Another possibility would be the existence of convergent genetic evolution in which some essential genotypes would be preserved independently of the selective pressures.

The third clone (C) contains only strains isolated in metropolitan Ribeirão Preto, indicating the presence and spread of a different founder MRSA ancestral strain.

Considering that the strains were isolated recently, from 2002 to 2005, the genetic profiles observed show that genetic divergent events occur considerably fast. This genetic recombinant events, preserving certain successful “variable” genotypes. In summary, the results herein obtained indicate the possible existence of three main MRSA strain clones in Southeast Brazil, all of them raised possibly due to local selective pressures and to genetic recombination events. This suggests that a high genetic variability would also exist in other Brazilian regions. The so-called Brazilian Epidemic Clone (Souza et al., 1998) would be one of the existing clones in Brazil, but others yet undetected must also exist.

The study of MRSA strains by a sum of techniques like the ones employed in this work also demonstrates that MRSA has a high genetic variability. These techniques may be used either before PFGE or in place of PFGE, but comparative studies are still required. If this is true, the study of bacterial population in a fast and little expensive way is an open possibility.

## **Acknowledgments**

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) grant No. 03/08407-0 and CAPES grant No. 832386/1999-5. The authors are thankful to Dr. Maria Clara Padoveze (Padoveze et al., 2001) from Campinas University for the donation of strains 257A, 20COA, 256B, and HC562, and to Dr. Agnes M. Figueiredo (Soares et al., 2001) from Universidade Federal do Rio de Janeiro for the donation of strains BEC 9393 and HC 562.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aires de Sousa et al., 1996 M. Aires de Sousa, I. S. Sanches, A. van Belkum, W. van Leeuwen, H. Verbrugh, and H. de Lencastre, Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods, *Microb. Drug Resist* **2** (1996), pp. 331–341.

Ausubel et al., 1988 F.M. Ausubel, R. Brente, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman, and K. Struhl, *Curr. Prot. Mol. Biol.* Green Publishing Associates, Brooklyn, NY, 1998.

Ayliffe, 1997 G.A.J. Ayliffe, The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clin. Infect. Dis.* **24** (1997), pp. S74-S79.

Diep et al., 2003 B.A. Perdreau-Remington and George F. Sensabaugh, Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* by Multilocus Restriction Fragment Typing, a Rapid Screening Approach for Molecular Epidemiology, *J. Clin. Microbiol.*, **41** (2003), pp. 4559-4564

Blanc et al., 1996 D.S. Blanc, C. Petignat, P. Moreillon, A. Wenger, J. Bille, and P. Francioli, Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: comparison with molecular typing, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **17** (1996), pp. 654-659.

Branchini et al., 1993 M.L.M. Branchini, V.H. Morthland, A.T. Tresoldi, Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **7** (1993), pp. 275-81.

Campanile et al., 2001 F. Campanile, V. Cafiso, C. Cascone, V. Giannino V, O. Di Marco, and S. Stefani, Clonal diffusion and evolution of *mecA* and Tn554 polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Italy Infez. Med.* **9** (2001), pp. 30-38.

Coimbra et al., 2000 M.V.S. Coimbra, L.A. Teixeira, R.L.B. Ramos, S.C. Predari, L. Castelo, and A.M.S. Figueiredo, Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina, *J. Med. Microbiol.* **49** (2000), pp. 187-192.

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

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

Koreen et al., 2004 L. Koreen, S.V. Ramaswamy, E.A. Graviss, S. Naidich, J.M. Musser, and B.N. Kreiswirth, *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation, *J. Clin. Microbiol.* **42** (2004), pp. 792-799.

Mato et al., 1998 R. Mato, I. Santos Sanches, M. Venditti, D.J. Platt, A. Brown, and H. de Lencastre, Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland, *Microb. Drug Resist.* **4** (1998), pp. 107–112.

Meier et al., 1996 P.A Meier, C.D. Carter, S.E. Wallace, R.J. Hollis, M.A. Pfaller, and L.A. Herwaldt, A prolonged outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the burn unit of a tertiary medical center, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **17** (1996), pp. 798-802.

Melter et al., 1999 O. Melter, I. Santos-Sanches, J. Schindler, H. Zemlickova, and H. De Lencastre, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic, *J. Clin. Microbiol.* **37** (1999), pp. 2798-2803.

Montesinos et al., 2002 I. Montesinos, E. Salido, T. Delgado, M. Cuervo, and A. Sierra, Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms, *J. Clin. Microbiol.* **40**: (2002), pp. 2119-2125.

Na'was et al., 1998 T. Na'was, A. Hawwari, E. Hendrix, J. Hebden, R. Edelman, M. Martin, W. Campbell, R. Naso, R. Schwalbe, and A. I. Fattom, Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients, *J. Clin. Microbiol.* **36** (1998), pp. 414-420.

Oliveira et al., 2002 A. Oliveira, and M. Ramos, PCR- based ribotyping of *Staphylococcus aureus*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35** (2002), pp. 175-80.

Oliveira et al., 1998 D. Oliveira, M. Tamayo, I. Santos Sanches, and H. de Lencastre, Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the: largest teaching hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains the "Iberian" and the "Brazilian" clones of MRSA, *Clin. Microbiol. Infect.* **7** (1998), pp. 373-384.

Peacock et al., 2002 S.J. Peacock, G.D. de Silva, A. Justice, A. Cowland, C.E. Moore, C.G. Winearls, and N.P. Day, Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting, *J. Clin. Microbiol.* **40** (2002), pp. 3764-3770.

Rohlf, F.J. NTSYS-PC 2.1. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, NY, 1997.

Rubin et al., 1999 R.J. Rubin, C.A. Harrington, A. Poon, K. Dietrich, and J.A. Greene, Impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals, *Emerg. Infect. Dis.* **5** (1999), pp. 9-17.

Sanches et al., 1995 I.S. Sanches, M. Aires de Sousa, L. Cleto, M. Baeta de Campos, and H. de Lencastre, Tracing the origin of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a Portuguese hospital by molecular fingerprinting methods, *Microb. Drug Resist.* **2** (1995), pp. 319–329.

Sambrook et al., 1989 J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual. New York Cold Spring Harbour, 1989.

Sanches et al., 1995 I.S. Sanches, M. Aires de Sousa, L. Sobral, I. Calheiros, L. Felicio, I. Pedra, and H. de Lencastre, Multidrug-resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal, *Microb. Drug Resist.* **1** (1995), pp. 299–306.

Waddington, D.E. Dodge, D.A. Bost, M. Riehman, S. Naidich, and B.N. Kreiswirth, Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains, *J. Clin. Microbiol.* **37** (1999), pp. 3556-3563.

Soares et al., 2001 M.J.S. Soares, L.A. Teixeira, M.R. Nunes, M.C.S. Carvalho, B.T. Ferreira-Carvalho, and A.M.S. Figueiredo, Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone, *J. Med. Microbiol.* **50** (2001), pp. 732-742.

Soares et al., 2000 M.L.S. Soares, M.V. Silva-Carvalho, B.T. Ferreira-Carvalho, and A.M.S. Figueiredo, Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogeneous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates, *J. Hosp. Infect.* **44** (2000), pp. 301-308.

Sousa et al., 1998 M.A. Sousa, I.S. Sanches, M.L. Ferro, M.J. Vaz, Z. Saraiva, T. Tendeiro, J. Serra, and H. de Lencastre, Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone, *J. Clin. Microbiol.* **36** (1998), pp. 2590-2596.

Souza et al., 2003 M.A. Souza, M.I. Crisostomo, I.S. Sanches, J.S. Fuzhong, A. Tomasz, and H. De Lencastre, Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China, *J. Clin. Microbiol.* **41** (2003), pp. 159-163.

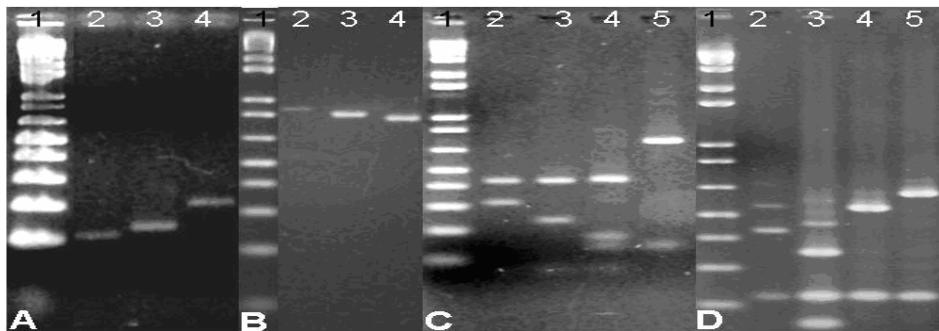
Teixeira et al., 1995 L. Teixeira, C.A. Resende, L.R. Ormonde, R. Rosenbaum, A.M.S. Figueiredo, H. de Lencastre, and A. Tomasz, Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil, *J. Clin. Microbiol.* **33** (1995), pp. 2400–2404.

Tenover et al., 1995 F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33** (1995), pp. 2233-2239.

**Table 1.** Strains with identical similarity and the cluster in which these strains are grouped.

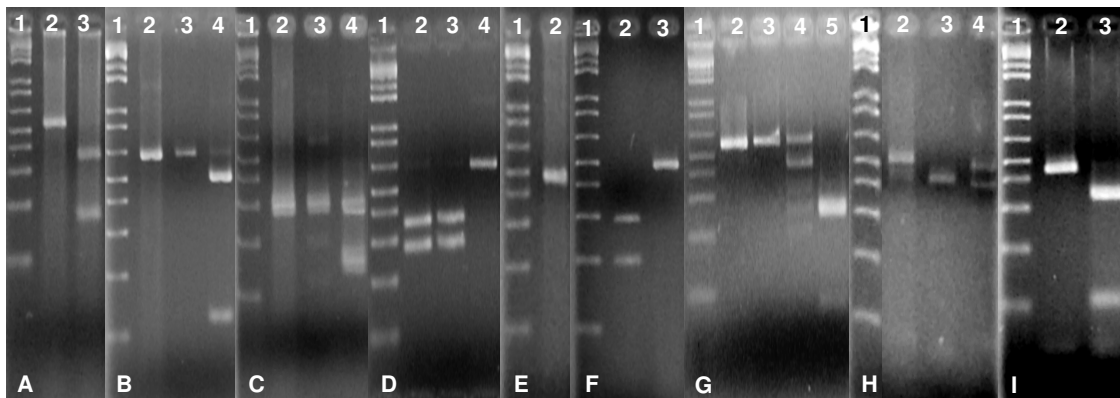
| <b>Representative Strains</b> | <b>Strains with 100% of similarity</b>                                                    | <b>Cluster</b> | <b>TOTAL</b> |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------|
| 7                             | 14;35;72;131;157;185                                                                      | A              | 7            |
| 257A                          | 20COA                                                                                     | A              | 2            |
| 5                             | 8,34,35,36,37,39,41,43,45,48,50,123,124,125,139,146,152,161,169,170,171,179               | B              | 23           |
| 4                             | 46,102,107,109,122,142;150,164,167,168,172,184,187                                        | B              | 14           |
| 12                            | 16,17,20,58,141;                                                                          | B              | 6            |
| 106                           | 130                                                                                       | B              | 2            |
| 180                           | 181;135,140                                                                               | B              | 4            |
| 06                            | 18;19;21;22;23;28;30;31;32;66;71;74;75;80;8;86;94;97;99;110;143;149;155;156;173;174;9;162 | B              | 27           |
| 10                            | 89                                                                                        | B              | 2            |

Figure 1



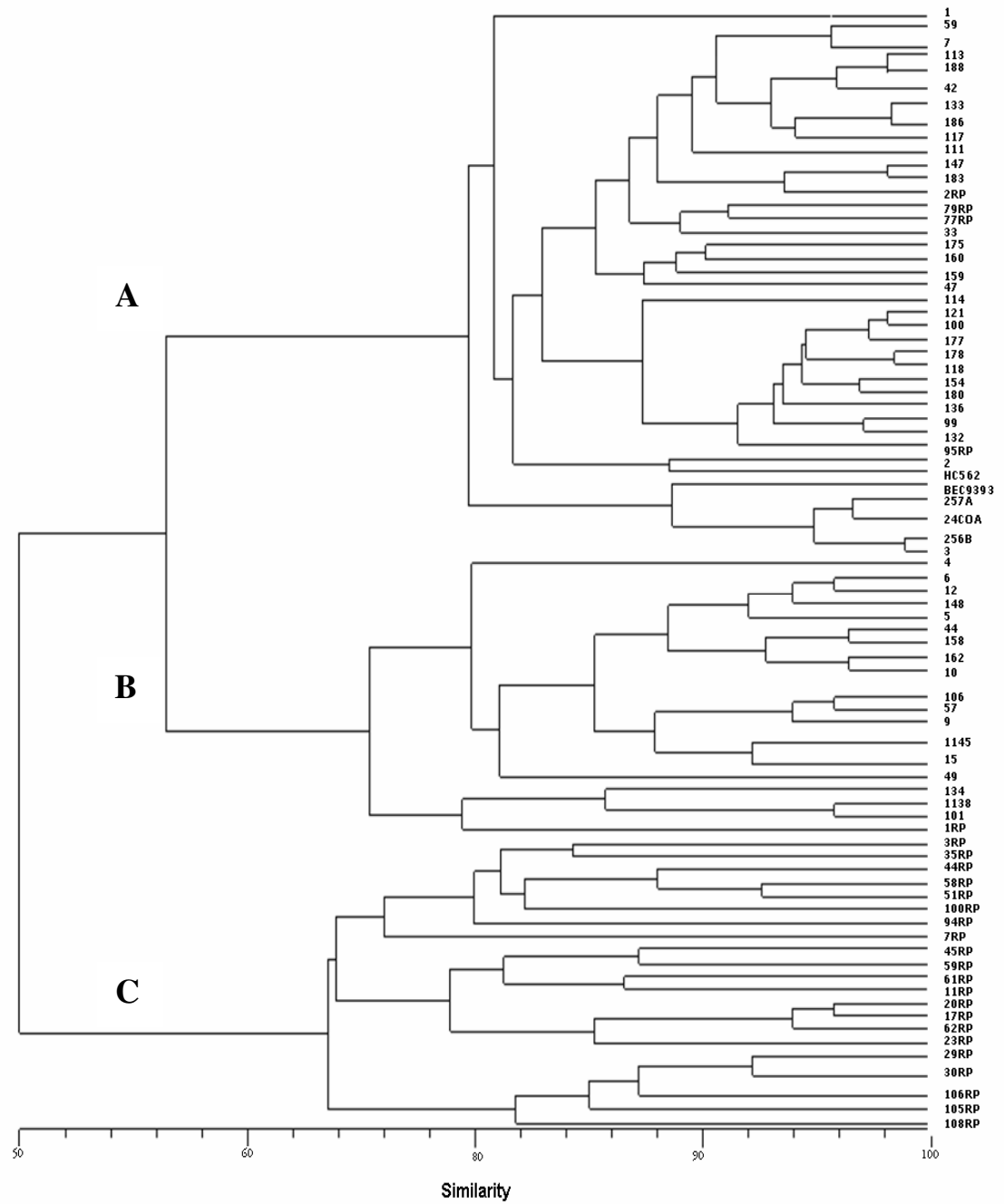
**Figure 1.** Agarose (1.5%) gel electrophoresis of PCR-amplified fragments *spa* and *coa* genes. **(1)** Molecular weight 1Kb marker; **(A)** amplified *spa* fragments; **(B)** *coa* fragments obtained after PCR; **(C)** *coa* fragments obtained after digestion with enzyme *Hae* III; **(D)** *coa* fragments obtained after digestion with enzyme *Alu* I.

Figure 2



**Figure 2.** Agarose (1.5%) gel electrophoresis of PCR-amplified fragments of housekeeping genes and fragments obtained after digestion with different restriction enzymes. **(1)** Molecular weight 1Kb marker; **(A)** locus *aroE* (enzyme *Cfo*I); **(B)** locus *yqiL* (enzyme *Vsp*I); **(C)** locus *pta* (enzyme *Rsa*I); **(D)** locus *yqiL* (enzyme *Dde*I); **(E)** locus *tpi* (enzyme *Bbu*I); **(F)** locus *tpi* (enzyme *Mbo*I); **(G)** locus *arcC* (enzyme *Hinf*I); **(H)** locus *aroE* (enzyme *Alu*I); **(I)** locus *gmk* (enzyme *Cfo*I).

Figure 3



**Figure 3.** Dendrogram of genetic similarity of strains.

## **4- COCNLUSÃO GERAL**

Os métodos empregados foram capazes de discriminar e agrupar os isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina analisados em conglomerados e estabelecer linhagens.

Na prática, esses métodos se mostraram trabalhosos e de custo elevado.

Três linhagens principais foram caracterizadas, provavelmente selecionadas por pressões e eventos de recombinação genética.

A linhagem representativa do Clone Brasileiro Epidêmico foi caracterizada como pertencendo ao conglomerado A.

A caracterização de outras linhagens (B e C) leva a supor que devem existir outras linhagens de *S. aureus* oxacilina resistente, não relacionadas ao Clone Brasileiro Epidêmico.

## **5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aires de Sousa M, Sanches IS, van Belkum A, Van Leeuwen W, Verbrugh H, Lencastre H de. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods. Microb Drug Resist 1996; 2:331–41.

Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1997; 24:S74-9.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, et al. Curr Prot Mol Biol; Green Publishing Associates Brooklyn, NY 1998.

Blanc DS, Petignat C, Moreillon P, Wenger A, Bille J, Francioli P. Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: comparison with molecular typing. Infect Control Hosp Epidemiol 1996; 17:654-9.

Branchini MLM, Morthland VH, Tresoldi AT. Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 7:275-81.

Campanile F, Cafiso V, Cascone C, Giannino V, Di Marco O, Stefani S. Clonal diffusion and evolution of *mecA* and Tn554 polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Italy Infez Med 2001; 9:30-8.

Coimbra MVS, Teixeira LA, Ramos RLB, Predari SC, Castelo L, Figueiredo AMS. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. J Med Microbiol 2000; 49:187-92.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Survey of blood stream infections due to gram-positive bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Clin Infect Dis 1999; 29:595-607.

Diep BA, Perdreau Remington F, George F. Sensabaugh, Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* by Multilocus Restriction Fragment Typing, a Rapid Screening Approach for Molecular Epidemiology. J Clin Microbiol 2003; 41: 4559-64.

Dominguez MAH, Lencastre H de, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. J Clin Microbiol 1994; 32: 2081-7.

Edmond MB, Wallace SE, MacClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospital: a 3-yers analysis. Clin.Infect.Dis 1999; 29:239-44.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin- resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38:1008-15.

Felmingham D, Gruneberg RN, Alexander Projetc Group. The Alexander Projetc 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother 2000; 45:191-203.

Frénay HME, Theelen JPG, Schouls LM, Vanderbrouke-Grauls CMJE, Verhoef J, Mooi FR. Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains an the basis of protein A gene polymorphism. J Clin Microbiol 1994; 32:846-7.

Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in united States hospitals: project ICARE, phase 2. Clin Infect Dis 1999; 29:245-52.

Goh SH, Byrne ASK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphismo. J Clin Microbiol 1992; 30:1642-5.

Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struieens MJS, Van Lierde, VanEldere J. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1997; 35:2514-20.

Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene. J Clin Microbiol 1998; 36:1083-9.

Jarvis WR, Edwards JR, Culver DH. Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. Am J Med 1991; 91(3B): 185S-91S.

Kerr GE, Mackintosh CA, Marples RR. A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. J Hosp Infect 1990; 16(1):35-48.

Kloss WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In PR Murray, EJ Baron, Ma Pfaller, FC tenover, RH Yolkrn (eds), Manual of Clinical Microbiology, ASM press, Washigton DC 1999,p. 282-98.

Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol 2004; 42:792-9.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339(8):520-32.

Maranam MC, Moura B, Boyce-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistant in *Staphylococci*. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. Infect Dis Clin North Am 1997; 11(4):813-49.

Mato R, Santos Sanches I, Venditti M, Platt DJ, Brown A, Lencastre H de. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin resistance

*Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. Microb Drug Resist 1998; 4:107–12.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SKm, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol 2003; 1:5113-20.

Meier PA, Carter CD, Wallace SE, Hollis RJ, Pfaller MA, Herwaldt LA. A prolonged outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the burn unit of a tertiary medical center. Infect Control Hosp Epidemiol 1996; 17:798-802.

Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Zemlickova H, Lencastre H de. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J Clin Microbiol 1999; 37:2798-803.

Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. J Clin Microbiol 2002; 40:2119-25.

Na'was T, Hawwari A, Hendrix E, Hebden J, Edelman R, Martin M, et al. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. J Clin Microbiol 1998; 36:414-20.

Oliveira A, Ramos M. PCR- based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. Braz J Med Biol Res 2002; 35:175-80.

Oliveira D, Tamayo M, Santos Sanches I, Lencastre H de. Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the largest teaching hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the "Iberian" and the "Brazilian" clones of MRSA. Clin Microbiol Infect 1998; 7: 373-84.

Peacock SJ, Silva GD da, Justice A, Cowland A, Moore CE, Winearls CG, et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. J Clin Microbiol 2002; 40:3764-70.

Roberts RB, Gaston A. Protein A and Coagulase expression in epidemic and non-epidemic *Staphylococcus aureus*. J Clin Pathol 1987; 40(8):837-40.

Rohlf FJ. NTSYS-PC 2.1. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, NY; 1997.

Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA. Impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. Emerg Infect Dis 1999; 5:9-17.

Sader SH, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospital: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Braz J Infect Dis 2001; 5(4):200-14.

Sahm DF, Marsilio MK, Piazza G. Antimicrobial resistance in key bloodstream bacterial isolates: electronic surveillance with The Surveillance Network database - United States. Clin Infect Dis 1999; 29:259-63.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York Cold Spring Harbour; 1989.

Sanches IS, Aires de Sousa M, Cleto L, Baeta de Campos M, Lencastre H de. Tracing the origin of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a Portuguese hospital by molecular fingerprinting methods. Microb Drug Resist 1995a; 2:319–29.

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

Sanches IS, Ramirez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, et al. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. J Clin Microbiol 1995c; 33:1243–6.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1999; 37:3556-63.

Soares MJS, Teixeira LA, Nunes MR, Carvalho MCS, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo MSA. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. J Med Microbiol 2001; 50:732-42.

Souza MA, Crisostomo MI, Sanches IS, Fuzhong JS, Tomasz A, Lencastre H de. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. J Clin Microbiol 2003; 41:159-63.

Souza MA, Sanches IS, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. J Clin Microbiol 1998; 36:2590-6.

Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. Br Med J 1963; 1(5326):308-11.

Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, Serruys E. Epidemiological typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using Pulsed-field electrophoresis. J Clin Microbiol 1992; 30:2599-605.

Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, et al. Comparison of protein A gene sequencing with Pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38(4):1347-51.

Teixeira L, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AMS, Lencastre H de, et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol 1995; 33:2400-4.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.

Townsend DE, Astidown N, Bolton S, Breadley J, Dudlworth G, Moorhouse EC, et al. The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 1987; 9(1):60-71.

Van Wamel WJ, Fluit AC, Wadstrok T, van Dijk H, Verhoef J, Vanderbroucke Grauls CM. Phenotypic characterization of epidemic versus sporadic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1995; 33(7):1769-74.

Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1980; 77(11):6754-8.

## **ANEXO**

**Tabela 2.** “Primers” usados para amplificação dos diferentes fragmentos genômicos.

| Oligonucleotídeos    | Sequência 5' - 3'        | Descrição           |
|----------------------|--------------------------|---------------------|
| coa1 <sup>(1)</sup>  | AACAAAGCGGCCCATCATTAAG   | <i>coa</i> forward  |
| coa2 <sup>(1)</sup>  | TAAGAAATATGCTCCGATTGTCG  | <i>coa</i> reverse  |
| spa1 <sup>(1)</sup>  | TCAAGCACCAAAAGAGGAAGA    | <i>spa</i> forward  |
| spa2 <sup>(2)</sup>  | GTTTAACGACATGTACTCCGTTG  | <i>spa</i> reverse  |
| arcC1 <sup>(2)</sup> | TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC  | <i>arcC</i> forward |
| arcC2 <sup>(2)</sup> | AGGTATCTGCTTCAATCAGCG    | <i>arcC</i> reverse |
| aroE1 <sup>(2)</sup> | ATCGGAAATCCTATTTACATTC   | <i>aroE</i> forward |
| aroE2 <sup>(2)</sup> | GGTGTTGTATTAATAACGATATC  | <i>aroE</i> reverse |
| Gmk1 <sup>(2)</sup>  | ATCGTTTTATCGGGACCATC     | <i>gmk</i> forward  |
| Gmk2 <sup>(2)</sup>  | TCATTAAC TACAACGTAATCGTA | <i>gmk</i> reverse  |
| Pta1 <sup>(2)</sup>  | GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG  | <i>pta</i> forward  |
| Pta2 <sup>(2)</sup>  | GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA   | <i>pta</i> reverse  |
| Tpi1 <sup>(2)</sup>  | TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA | <i>tpi</i> forward  |
| Tpi2 <sup>(2)</sup>  | TTTGACCTTCTAACAATTGTAC   | <i>tpi</i> reverse  |
| yqiL1 <sup>(2)</sup> | CAGCATACAGGACACCTATTGGC  | <i>yqiL</i> forward |
| yqiL2 <sup>(2)</sup> | CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC  | <i>yqiL</i> reverse |

(1) Montesinos *et al.* (2002); (2) Enright *et al.* (2000)