

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas

Resistência à meticilina mediada
pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus spp*
coagulase negativa

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Dissertação de Mestrado

2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas

Resistência à meticilina mediada
pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus spp*
coagulase negativa

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Dissertação de Mestrado

2007

“A permanência é uma ilusão

Só a mudança é real

É impossível pisar duas vezes no mesmo rio “

Heráclito

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Afonso Luis Barth pela sua orientação em todos os momentos da execução deste trabalho, pela grande paciência e generosidade. Sobretudo pelo incentivo e equilíbrio nas horas difíceis.

A Dra. Susana Hoffmeister Barcellos (*in memorium*) primeira pessoa a julgar esta dissertação uma realidade.

Agradeço especialmente a sorte de ter como bolsista a aluna Keli Cristine Reiter com sua presença constante na execução deste trabalho, amizade, carinho, dedicação, disponibilidade e principalmente competência.

A todos os colegas da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular pela amizade, estímulo e auxílio técnico.

Ao Leandro Réus Rodrigues Peres pelo apoio técnico.

A Ana Lúcia Souza Antunes por ceder gentilmente os *primers* para realização do PCR para o gene *tuf*.

Ao Rodrigo Minuto Paiva e a Cristiane Piccinini Maurer que auxiliaram na coleta das amostras e no início da execução técnica do projeto.

Especialmente às minhas colegas Fernanda de Paris e Maria del Carmen Parareda Mur pela amizade e auxílio na rotina do laboratório sempre que tive que me afastar.

A minha amiga e colega de Laboratório de Biologia Molecular Daniela Ferreira Passos por indicar os caminhos corretos para realização do projeto, pelo incentivo e carinho.

A minha mãe Ilse Oppermann Mombach, pelo apoio incondicional, carinho e incentivo.

Ao meu filho Dulphe pela paciência e auxílio nas traduções. E aos meus filhos Thiago e Bruna pelo carinho e incentivo e compreensão em todas as horas que me afastei deles. A meu marido sou grata pela eterna e terna paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica, Unidade de Bacteriologia do Grupo Hospitalar Conceição pelo apoio e auxílio técnico para utilização do equipamento de semi-automação para identificação das espécies dos estafilococos.

A bioMèrieux, pelos insumos laboratoriais gentilmente cedidos para identificação das espécies dos estafilococos.

Nenhum caminho é trilhado solitariamente, nossos acompanhantes, muitas vezes são pessoas surpreendentes e que não escolhemos. Estes agradecimentos são na maioria para estas pessoas que nos acompanham e auxiliam inesperadamente e outras que ajudam por generosidade e amizade. Muito obrigada a todos que me acompanharam e auxiliaram durante estes anos, na execução deste trabalho.

*Dedico esta conquista a meus filhos
muito amados Dulphe, Thiago e Bruna,
a meu marido Dulphe e à minha mãe que
incondicionalmente me incentivou.*

ABREVIATURAS

AAP – proteína associada a acumulação

ATCC – *American Type Culture Collection*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

C-MRSA - *S.aureus* comunitário resistente a meticilina

MRS – *Staphylococcus* spp resistente a meticilina

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MR-SCoN – *Staphylococcus* spp coagulase negativa resistente a meticilina

MS-SCoN- *Staphylococcus* spp coagulase negativa sensível a meticilina

NCCLS- *National Committee of Clinical and Laboratory Standards*

PBP – *Penicillin Binding Protein* (Proteína ligadora de Penicilina)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PIA - adesina polissacarídica intercelular

PVL – *Panton-Valentine leucocidin*

SCC*mec* – Staphylococcal cassette chromosome *mec*

SCoN – *Staphylococcus* spp coagulase-negativa

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VPN - valor preditivo negativo

VPP - valor preditivo positivo

TABELAS

TABELA 1. Descrição dos tipos I a VI de <i>SCCmec</i>	44
TABELA 2. Elementos genéticos associados à resistência do <i>SCCmec</i> tipo II	48
TABELA 3. Elementos genéticos associados à resistência do <i>SCCmec</i> tipo III.....	49

FIGURAS

FIGURA 1. Organização genética do complexo <i>mec</i> em estafilococos e suas diferentes classes.....	38
FIGURA 2. Exemplo esquemático do elemento genético <i>SCCmec</i> tipo II com estruturas do complexo <i>ccr</i> e do complexo <i>mec</i>	41
FIGURA 3. Representação esquemática dos <i>SCCmec</i> I a VI com os principais elementos gênicos (<i>ccr</i> , IS431, IS1272, <i>mecA</i> , <i>mecl</i> , <i>mecRI</i> , <i>orfX</i> , p1258, pT181, pUB10 e Tn554) e com os quatro lócus A, B, D e E, indicados pelas letras utilizados para identificação dos tipos de <i>SCCmec</i>	50

SUMÁRIO

RESUMO...	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA.....	18
<i>Staphylococcus</i> spp coagulase negativa: peculiaridades da bactéria.....	18
Patogenicidade dos <i>Staphylococcus</i> spp coagulase negativa.....	21
Importância clínica das infecções por <i>Staphylococcus</i> spp coagulase negativa.....	24
Epidemiologia da resistência <i>Staphylococcus</i> spp coagulase negativa.....	26
Mecanismos de resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp coagulase negativa aos aos antibióticos β -lactâmicos.....	28
Regulação da expressão gênica do gene <i>mecA</i> e interferência do operon <i>bla</i> da β - lactamases.....	32
Resistência mediada pelo gene <i>mecA</i> e cassetes <i>SCCmec</i>	34
Descrição do complexo do gene <i>mec</i>	36
Descrição do complexo dos genes <i>ccr</i>	39
Estrutura dos principais tipos de <i>SCCmec</i>	42
A resistência codificada nos <i>SCCmec</i> e descrição atual.....	45
Métodos de detecção da resistência à meticilina.....	51
OBJETIVOS.....	54
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	55
ARTIGOS	

Are there discrepancies between detection <i>mecA</i> gene in coagulase-negative staphylococci by PCR and by cefoxitin and oxacillin discs? What's the role of β -lactamase hyperproduction?.....	73
“Versão em português do artigo: Are there discrepancies between detection <i>mecA</i> gene in coagulase-negative staphylococci by PCR and by cefoxitin and oxacillin disc? What's the role of β -lactamase hyperproduction?.....	95
Distribution of staphylococcal <i>cassette chromosome</i> (SCC <i>mec</i>) types I, II, III and IV in coagulase negative <i>Staphylococcus</i> spp in a tertiary care hospital in southern Brazil	118
Versão em português do artigo “Distribution of staphylococcal <i>cassette chromosome</i> (SCC <i>mec</i>) types I, II, III and IV in coagulase negative <i>Staphylococcus</i> spp in a tertiary care hospital in southern Brazil”.....	139
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	161
ANEXO.....	163

RESUMO

Os *Staphylococcus* spp coagulase negativa (SCoN) são reconhecidos como agentes etiológicos importantes de infecções humanas. A maioria dos países desenvolvidos relata um aumento de infecções nosocomiais por SCoN resistentes a meticilina e outros antibióticos. A resistência a meticilina é uma característica importante destas bactérias, porém difícil de detectar pelos métodos convencionais de suscetibilidade. Esta resistência é devido à presença de um elemento genético chamado *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*), que codifica o gene *mecA*. A identificação dos tipos de SCC*mec* é relevante para epidemiologia da resistência a meticilina dos *Staphylococcus* spp. Este estudo prospectivo teve como objetivo determinar a prevalência do gene *mecA* e a distribuição dos tipos de SCC*mec* nos SCoN. Também foi avaliada a eficiência do teste de disco difusão com cefoxitina e oxacilina para caracterizar a resistência a meticilina mediada pelo gene *mecA*. Foram analisadas um total de 181 SCoN de hemoculturas. A prevalência do gene *mecA* entre estes isolados foi de 71,3%. A sensibilidade dos discos de cefoxitina e oxacilina para todas as espécies de SCoN foi de 100% e 98,4%, respectivamente, enquanto que a especificidade foi de 93% e 89,3%. As espécies mais prevalentes de SCoN foram *S. epidermidis* (64%), seguido pelo *S. hominis* (10%), *S. haemolyticus* (8,8%) e *S. capitis* (7,7%). A percentagem de isolados positivos para o gene *mecA* foi maior para *S. haemolyticus* (98,3%), seguido pelo *S. epidermidis* (75%) e *S. hominis* (72,2%). Entre os 129 isolados resistentes, 36 (27,9%) foram identificados com o SCC*mec* tipo I, 4 (3,0%) com o SCC*mec* tipo II, 67 (52%) com o SCC*mec* tipo III, 1 (0,8%) com o SCC*mec* tipo IV e 4 (3,0%) com os SCC*mec* tipos I e III. Dezesete isolados foram não tipáveis. O SCC*mec* tipo III foi o mais prevalente entre os isolados de *S. epidermidis* (52%). Entre estas cepas, 30 (23%) apresentaram um SCC*mec* tipo III modificado, que amplificou uma região *dcs* adicional. Os SCoN meticilina resistentes (MR-SCoN) mostraram um nível de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos maior quando comparados aos SCoN meticilina suscetíveis (MS-SCoN). Os isolados com o SCC*mec* tipo III foram mais resistentes aos antibióticos não β -lactâmicos do que os isolados com SCC*mec* tipos I, II, e IV.

ABSTRACT

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are now recognized as important etiological agents of infections in humans. Most developed countries have reported an increase in CoNS infection in hospitalized patients, which are resistant to methicillin and other antibiotics. The methicillin resistance is an important characteristic of these bacteria. Moreover, the resistance to methicillin may not be easily detected by conventional susceptibility methods. Methicillin resistance is due to the acquisition of a large DNA element termed staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), which harbored the *mecA* gene. The SCC*mec* typing is essential for understanding the molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus* spp. This prospective study was aimed to determine the prevalence of *mecA* gene and the distribution of SCC*mec* types in CoNS. Also was evaluated the efficiency of the cefoxitin and oxacilin disk diffusion test to characterize the methicillin resistance mediated by the gene *mecA*. A total of 181 CoNS from bloodstream isolate were available for the study. The prevalence to *mecA* gene was 71.3%. The sensitivity of oxacillin and cefoxitin disks for all CoNS species were 100% and 98.4% respectively, whereas the specificity were 93% and 89,3 %. The most prevalent SCoN species were: *S. epidermidis* 116 (64%) followed by *S. hominis* 18 (10%), *S. haemolyticus* 16 (8.8%) and *S. capitis* 14 (7.7%). The percentage of *mecA*-positive isolates was highest for *S. haemolyticus* (93.8%), followed by *S. epidermidis* (75%) and *S. hominis* (72.2%). Among the 129 bloodstream isolates with *mecA* gene, 36 (27.9%) harbored SCC*mec* type I, 4 (3.0%) harbored SCC*mec* type II, 67 (52%) harbored SCC*mec* type III, 1 (0.8%) harbored SCC*mec* type IV and 4 (3.0%) harbored SCC*mec* type I and III. Seventeen isolates were not typeable. The SCC*mec* type III was the most prevalent among the isolates of *S. epidermidis* (52%). Among these strains, 30 (23%) harbored a modified SCC*mec* type III, which contained, in contrast to regular type III, an additional *dcs* region. Methicillin resistant CoNS showed higher level of resistance to all non beta lactamics antimicrobials as compared to methicillin susceptible. The isolates with SCC*mec* type III were more resistant to non-beta lactamics antimicrobials than the isolates harboring SCC*mec* type I, II and IV.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é composto de 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo dividido em dois grandes grupos: os *Staphylococcus* coagulase positiva, cujo principal representante é o *S. aureus* e os *Staphylococcus spp* coagulase negativa (SCoN). Os SCoN mais freqüentes associados a infecções humanas são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* (1).

Os SCoN são bactérias importantes na composição da microbiota normal da pele e da mucosa humana, mas em condições apropriadas podem causar infecções oportunistas nosocomiais e comunitárias. Quando a barreira cutânea natural é rompida por trauma, esses organismos podem entrar nos tecidos do hospedeiro e se desenvolver como um patógeno. Além disso, os SCoN apresentam mecanismos de virulência complexos que tornam difícil a sua erradicação (1) Nas últimas décadas houve um aumento dos casos de infecções devido ao SCoN, principalmente bacteremias nosocomiais que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade. Esta bactéria é freqüentemente isolada em neonatos, em pacientes imunocomprometidos, pacientes portadores de válvulas cardíacas e pacientes de unidades de tratamento intensivo onde é freqüente a utilização de processos invasivos (10, 70).

Os *S. aureus* tornaram-se resistentes às penicilinas logo após o início do uso sistemático da penicilina G em 1941, registrando-se em 1944 e 1945 índices de resistência de 12 a 22%. Em 1950, cerca de cinco anos após a disponibilidade da penicilina G para o tratamento da população, a resistência já atingia cerca de 30%

das amostras hospitalares americanas. Ao final da década de 1950, cerca de 80% dos *Staphylococcus aureus* isolados em hospitais americanos mostravam-se resistentes às penicilinas, devido à produção de penicilinases (β -lactamase) que inativam estas drogas (34, 63).

Atualmente, em praticamente todas as partes do mundo, os *Staphylococcus spp* comunitários, sejam coagulase positiva ou coagulase negativa, mostram elevada resistência (acima de 60%) a benzilpenicilina (penicilina G) bem como a penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina. Para combater os estafilococos produtores de β -lactamase foram criadas as penicilinas semi-sintéticas como a oxacilina, metilina, nafcilina e dicloxacilina, que possuem radicais que as protegem da ação das β lactamases. Porém já em 1961 surgiram bactérias resistentes a estas novas penicilinas, na Europa, comprovando a plasticidade do genoma desta bactéria e a capacidade dos *Staphylococcus spp* em se adaptar à pressão seletiva dos antibióticos (34, 63).

O aparecimento de cepas de SCoN resistentes à metilina ou oxacilina, que é um análogo mais estável da metilina, tornou-se um problema clínico grave, nas últimas décadas. Esta resistência é determinada pela alteração da enzima alvo dos antibióticos β -lactâmicos. A alteração produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antibiótico, codificada pelo gene *mecA*. Os isolados de MR-SCoN, pela presença do gene *mecA*, podem representar em torno de 75% das cepas de SCoN isoladas de pacientes hospitalizados (9, 57). Os *Staphylococcus spp* resistentes à metilina (MRS) são resistentes a todas as penicilinas, penicilinas semi-sintéticas, penicilinas resistentes a penicilinases, aztreonam, carbapenens e cefalosporinas,

restando poucas opções terapêuticas e levando à emergência de cepas multiresistentes (6, 41).

O gene *mecA* tem origem cromossômica, está localizado em um elemento genético móvel chamado “*staphylococcal cassette chromosome mec*” (*SCCmec*). Este elemento genético móvel é amplamente distribuído entre os *Staphylococcus aureus* e entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (25). Porém o fenótipo de resistência à metilina é determinado, não só pela expressão do gene *mecA*, mas também pelos elementos genéticos próximos ao gene *mecA* no cromossomo como transposons e seqüências de inserção (40).

O tipo de *SCCmec* é definido pela combinação do tipo de gene das *ccrs*, recombinases responsáveis pela mobilidade do elemento e a classe do complexo do gene *mecA*. Foram identificados seis diferentes tipos do elemento *SCCmec* (25, 28, 33, 54). Quatro tipos de elementos *SCCmec* (tipo I, II, III e VI) são associados a infecções nosocomiais. Os tipos de *SCCmec* IV e V são amplamente disseminados entre cepas comunitárias (21).

Estudos recentes sobre o *SCCmec* tipo IV demonstraram que os SCoN são reservatórios de resistência e que a transmissão ocorreu dos SCoN para os *S.aureus*. Quando avaliados em relação à presença do *SCCmec*, isolados clínicos de *S.epidermidis* da década de 70, apresentavam o *SCCmec* tipo IV enquanto que os *S.aureus* desta mesma época ainda não apresentavam este tipo de elemento móvel. Apenas na década de 80 foi encontrado o isotipo IV em isolados clínicos de *S.aureus* (87).

Atualmente a detecção molecular do gene *mecA* é considerada padrão ouro para determinar a resistência à meticilina, isso se deve ao fato de que os métodos fenotípicos podem ser difíceis de interpretar e de que alguns isolados de estafilococos não expressam o gene *mecA* sem que exista a pressão seletiva via tratamento com o antibiótico (5, 23, 41).

REVISÃO DA LITERATURA

***Staphylococcus* spp coagulase negativa: peculiaridades da bactéria**

Os *Staphylococcus* spp são bactérias Gram positivas de forma cocoide, se apresentam em pares ou tétrades ou mesmo cadeias curtas, produzem a enzima catalase e algumas espécies produzem enzimas e toxinas como: coagulase, hialuronidase, enterotoxinas, toxinas, hemolisinas e leucocidinas. Estes fatores de virulência são indicativos de potencial capacidade de produzir doenças e alguns são marcadores de espécie (1). Em 1894 Van de Valde observou que os *S. aureus* produziam uma enzima que ele denominou de leucocidina, quase quatro décadas após Valentine conseguiu esboçar o mecanismo de ação desta toxina (3). Esta leucocidina hoje denominada *Panton-Valentine leucodidin* (PVL) é conhecida em todo mundo devido a sua disseminação em cepas virulentas de estafilococos comunitárias. Aparentemente a patogenicidade dos estafilococos continuará despertando interesse da comunidade científica pela sua capacidade toxigênica e capacidade plástica em desenvolver resistência (77).

Estudos recentes da composição do DNA, hibridização DNA-rRNA, e análise comparativa de oligonucleotídeos da região 16S do rRNA, revelaram que o gênero *Staphylococcus* é estreitamente relacionado com o recente gênero descrito *Macrococcus*, contudo, ele também tem uma relação muito forte com os gêneros *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Gamela*, *Listeria*, *Planococcus* e *Brochothrix*. Atualmente estes gêneros estão sendo agrupados com o *Staphylococcus* e muitos outros

gêneros da Família *Bacillacea* (34). A classificação filogenética demonstrada pela análise da seqüência do 16S ribossomal evidencia uma relação evolucionaria a partir de um ancestral comum entre os dois gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus*. Comparando o genoma do *S. aureus* com o do *Bacillo subtilis* foi encontrado 52% de homologia entre os genes destas bactérias (30).

A parede celular das batérias Gram positivas, como os estafilococos, tem como principal função a proteção contra lise osmótica. Pela sua natureza confere forma, rigidez e funciona como uma barreira em relação ao meio externo. O principal componente da estrutura química da parede celular dos estafilococos é formado pelo peptideoglicano, um polímero que consiste em longas cadeias de glicídios com ligações cruzadas flexíveis de peptídeos que forma uma estrutura forte, mas elástica (66). Desta maneira, o peptideoglicano forma uma rede covalentemente fechada, como um corpo oco, ao redor da bactéria (22). Esta rede é formada por um precursor que consiste em um dissacarídeo formado por alternância de beta-1-4-N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmuramico, ligado ao peptideo L-alanina, D-glutamina, L-lisina e D-alanina que permite a ligação cruzada com um grupamento de pentaglicinas. Os peptídios são ligados um ao outro por reações de transpeptidação e os dissacarídeos são polimerizados ao longo da cadeia de glicano por reações de transglicolização (12).

Esta estrutura é o principal componente do peptideoglicano. O processo da ligação cruzada é catalizada por enzimas transpeptidases, as proteínas ligadora de penicilina PBPs (22). Cerca de 50% do total da massa da parede celular consiste de ácido teicoico, um polímero covalentemente ligado ao ácido murâmico do peptideoglicano por pontes fosfodiester. Esta estrutura compacta na parede celular

da bactéria evidencia a necessidade de um complexo de hidrolases para dividir e separar as células durante a fase de crescimento. O distúrbio do controle deste mecanismo leva a lise celular, esta é a razão pela qual estas hidrolases endógenas são chamadas de autolisinas (12).

O conceito de que a parede celular das bactérias Gram positivas é uma estrutura compacta, começa a mudar. A análise detalhada desta estrutura por microscopia eletrônica nos *S. aureus* sugere fortemente a existência de um espaço periplásmico composto principalmente de constituintes solúveis de baixa densidade, confinado entre a membrana plasmática e a estrutura do peptidoglicano-ácido teicoico. Esta nova descoberta pode vir a elucidar mecanismos até hoje desconhecidos (43).

Patogenicidade dos *Staphylococcus* spp coagulase negativa

O *S. epidermidis* é o principal patógeno oportunista entre os SCoN, é o microorganismo recuperado com maior frequência representando entre 50% a 80% dos isolados clínicos (34). Um estudo recente sobre a evolução da virulência e resistência com análise completa do genoma sugere que esta bactéria contenha o *cap* operon, que codifica a cápsula de poliglutamato, o principal fator de virulência do *Bacillus anthracis*. Também foi descrita a descoberta de uma ilha genômica a *vSey* que pode estar associada a um potencial fator de virulência. A análise de todo genoma indica a existência de outras regiões que podem estar associadas à virulência como *SCCmec*, seqüências de inserção (IS), transposons e plasmídeos integrados (13).

Os *S. haemolyticus*, entre os SCoN, são a segunda espécie mais isolada em hemoculturas e frequentemente resistentes a um grande número de antimicrobianos, com predisposição de resistência aos glicopeptídeos (76). As infecções causadas pelos *S. lugdunensis* em termos de virulência e destruição tecidual têm o mesmo curso clínico que infecções causadas por *S.aureus*, pois ambas as espécies parecem ter os mesmos determinantes de virulência. Estas bactérias causam endocardite de válvula natural e outras infecções quase sempre clinicamente significativas (42, 78, 80). Os *S. saprophyticus* estão frequentemente associados a infecções do trato urinário em pacientes jovens e também em infecções nosocomiais. Outras espécies de SCoN associados a infecções nosocomiais, porém, menos frequentemente são os *S. Schleiferi* e *S. Warneri* e

formam uma variedade de produtos extracelulares (DNAse, lípase, protease, e α -hemolisina e β -hemolisinas) (34).

Porém, o principal fator de virulência dos SCoN está associado a formação do biofilme que propicia a adesão às superfícies plásticas (biomateriais) a corpos estranhos. A aderência é mediada por uma adesina intracelular polissacarídica (polímero de galactose-arabinose), codificada pelo operon *icaADBC* cujo nível de expressão influencia a expressão da resistência a meticilina (38). Os genes do *ica* operon foram identificados em 85% dos *S. epidermidis* e em 6% de *S. saprophyticus* isolados em hemoculturas (51).

O desenvolvimento do biofilme ocorre em duas etapas à primeira fase é uma rápida adesão da bactéria a superfície. A segunda fase de acumulação é mais prolongada e envolve a proliferação e adesão intercelular formando várias camadas de bactérias. A autolisina AtlE parece estar associada à adesão primária por interação hidrofóbica com a superfície abiótica (17). A segunda etapa envolve a produção das moléculas polissacarídica PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) e a AAP (*accumulation-associated protein*). A PIA é codificada pelo *ica* operon, (*icaADBC*) que parece ser o principal componente da adesão intercelular. O *ica* operon é composto pelos genes estruturais *icaADBC* e pelo *icaR* que está envolvido na regulação destes genes. Parece que a co-expressão do gene *icaD* e *icaA* potencializa a atividade de transferase do produto de expressão do gene (51).

O biofilme completamente formado é constituído por várias camadas de bactéria embebida em um material extracelular amorfo (*slime*) que consiste da complexa mistura de vários açúcares, constituintes da parede celular e proteínas

extracelulares e ácido teicóico. Plasma e proteínas do tecido conectivo como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, laminina, colágeno e o fator Von Willebrand têm sido descritos por estarem envolvidos nesse processo (84). Essa matriz extracelular pode atuar protegendo os microorganismos de agentes antimicrobianos administrados para tratar essas infecções, o que torna necessária a remoção do corpo estranho para que seja alcançada a cura (34).

A quantidade de biofilme produzida pode estar relacionada com a habilidade dos SCoN causar infecções. Clones endêmicos de SCoN que foram associados a doenças e que produzem biofilme podem persistir por longos períodos (dez anos) em unidades hospitalares como UTIs pediátricas (69).

Outra característica dos SCoN envolvida na patogênese e considerada importante fator de virulência é a alta taxa de resistência aos agentes antimicrobianos apresentada por estes microorganismos, principalmente a meticilina (6, 86).

Importância clínica das infecções por *Staphylococcus coagulase negativa*

O papel das espécies de SCoN como agentes de infecções nosocomiais tem sido reconhecido e bem documentado ao longo das duas últimas décadas, especialmente para a espécie *S. epidermidis*. O aumento no índice de infecção tem sido correlacionado com o aumento no uso de materiais implantados e com o número crescente de pacientes imunocomprometidos nos hospitais (1, 83).

Os tipos de infecções mais graves e com alta morbidade e mortalidade, associadas aos SCoN são bacteremias relacionadas a cateter e endocardites de válvula protética e natural. Porém estas bactérias podem causar uma infinidade de outras infecções, tais como: infecções associadas a dispositivos permanentes (próteses articulares, implantes de bombas intratecais, derivações para hemodiálise e cerebrospinais, marca passos, cateteres para diálise peritoneal, bacteremias em hospedeiros imunocomprometidos, osteomielite, endoftalmite pós-cirúrgica)(34).

Os SCoN são os microrganismos mais frequentemente isolados de culturas de cateteres, estas bactérias foram encontrados em 64% das culturas desse material em um hospital de Madri (82). Por esta razão, são também a causa mais comum de infecções relacionadas a cateter, entre elas a infecção da corrente circulatória (9). Porém, alguns destes isolados podem ser contaminantes, a contaminação ocorre na hora da coleta da hemocultura com os estafilococos da microbiota normal da pele. Mesmo considerando o papel relevante da contaminação os SCoN tornaram-se importantes patógenos nosocomiais (32, 38).

Relaciona-se a contaminação uma hemocultura positiva e duas ou mais hemoculturas do mesmo paciente a bacteremias verdadeiras. Porém estudos

recentes demonstraram dados contrários a este padrão, encontraram a mesma taxa de mortalidade em uma hemocultura positiva e em duas ou mais (16,2% e 10,8% respectivamente $P= 0,3$). As bacteremias por SCoN têm taxa de mortalidade significativa mesmo em uma única cultura positiva. Na presença de sinais de sepse a cultura única deve ser considerada clinicamente relevante (10).

Os *Staphylococcus* coagulase negativa são a maior causa de septicemias em recém nascidos pré-termo. Aproximadamente 16,6% de neonatos com baixo peso (<1500g) desenvolvem um episódio de bacteremia por SCoN. A bacteremia impacta negativamente na recuperação do neonato e é um evento que está associado a um aumento significativo da mortalidade e morbidade, bem como um aumento do tempo de internação e custos (69).

São duas as espécies de SCoN comumente envolvidas em endocardites o *S. epidermidis* é a espécie mais freqüente e pode causar endocardite de válvula nativa porém, causa prevalentemente endocardite de válvula protética (55, 70). Os *S. lugdunensis* pelas suas características virulentas podem causar endocardite de válvula nativa com sérias complicações clínicas (80).

Epidemiologia da resistência dos *Staphylococcus coagulase negativa*

Um estudo do “Programa de vigilância antimicrobiana SENTRY” para monitorar a prevalência dos patógenos e os padrões de resistência aos antimicrobianos realizado nos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa, relatam que os SCoN são a terceira causa em infecções sistêmicas nosocomiais e comunitárias e que são a segunda causa de infecções nosocomiais (9, 56, 57).

A distribuição das bacteremias mudou durante as últimas décadas. Um estudo realizado por Wisplinghoff e colaboradores (2004) mostrou a análise de 24.179 casos de infecções nosocomiais da corrente circulatória nos Estados Unidos, onde o isolado mais comum foi SCoN (31%) (86).

A resistência à meticilina nos *Staphylococcus spp* é um fenômeno mundial com marcadas variações geográficas, e com prevalências crescentes apesar dos esforços para conter o aumento da disseminação de cepas resistentes. Em algumas áreas da Europa a prevalência da resistência a meticilina já era descrita em 2002 como 60 a 70% para os SCoN (72).

Na Noruega apenas 2% dos *S. aureus* são resistentes à meticilina, porém os MR-SCoN são prevalentes. Nos isolados de hemoculturas 80% dos SCoN são resistentes a meticilina e esta prevalência é similar à relatada na Escandinávia (16).

Na Espanha, um estudo feito para avaliação da resistência à meticilina para os SCoN relatou um aumento de 32,5% em 1986 para 61,3% em 2002 (7). Neste mesmo país, em 2006, um estudo denominado “Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: VIRA” relata uma prevalência de resistência à meticilina de 70,6% (58).

A prevalência da resistência à metilina em hemoculturas, segundo o programa de vigilância SENTRY, encontrou uma taxa de resistência para os SCoN de 74% nos Estados Unidos, 73% no Canadá, 77% na América Latina, 73% na Europa e 77% no Japão (9). Sader e colaboradores em um estudo feito na Europa entre 2002 e 2004 para o Programa de Vigilância a Daptomicina também avaliaram resistência a metilina em 1.942 SCoN. Encontraram taxas de resistência para metilina bastante variadas. A maior resistência foi encontrada em Israel (94,7%) e a menor na Suécia (63%). Taxas intermediárias foram encontradas na França (77%), Espanha (76%) e Alemanha (69%) (65).

Segundo levantamento do SENTRY feito em hospitais brasileiros e da América Latina entre 1997 e 2001 a resistência para à metilina dos SCoN em hemoculturas é de 80,8% e 76,2% respectivamente (64).

Mecanismos de Resistência dos *Staphylococcus* spp coagulase negativa aos antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β lactâmicos produzem um efeito bactericida pela inibição das enzimas responsáveis por catalisar um estágio vital da biossíntese do peptídeoglicano, principal componente da parede celular das bactérias Gram positivas (12).

Esta inibição é o resultado de uma ligação covalente formando um complexo estável do antibiótico com uma ou mais destas enzimas denominadas PBPs (36). Quando o peptídeoglicano não pode ser formado, ocorre um distúrbio do mecanismo de controle das hidrolases (autolisinas), a bactéria entra em ciclo lítico e este processo pode levar a morte celular (12). Passados mais de 60 anos após o início da utilização sistemática da penicilina, seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido completamente. Porém, muito cedo se descobriu que altas concentrações de penicilina inibem o sistema autolítico da bactéria, causando um efeito apenas bacteriostático havendo perda do efeito bacteriolítico (12).

A resistência apresentada pelos estafilococos aos antibióticos β -lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos, porém não dissociados, pois ambos podem interagir. O primeiro mecanismo desenvolvido pela bactéria foi à produção da enzima β -lactamase que hidrolisa o antibiótico. O segundo mecanismo está associado à alteração do sítio de ação do antibiótico β -lactâmico pela produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional, a PBP2a (também denominada PBP 2'), que está ausente nos *Staphylococcus* spp sensíveis a meticilina (15).

O primeiro mecanismo se deve as β -lactamases produzidas pelos *Staphylococcus spp* que são enzimas extracelulares, codificadas por plasmídeos, e baseado em testes sorológicos e cinéticos, podem ser divididas em quatro tipos (A a D). Diferentemente das enzimas β -lactamases produzidas pelas bactérias Gram negativas, que são genericamente expressas de maneira constitutiva, as β -lactamases dos estafilococos, com exceção do tipo D, são expressas em altos níveis somente na presença dos indutores, como a penicilina ou seus análogos (11, 36). A regulação da expressão do gene *blaZ* das β -lactamases está sob controle de dois genes regulatórios adjacentes, o indutor *blaRI* e o gene repressor *blaI*. A inibição ocorre quando o produto do gene *blaI*, supostamente um tetrâmero, se liga ao operador do gene estrutural *blaZ* bloqueando a transcrição do gene. Por outro lado à transcrição ocorre quando o produto da clivagem do BlaR1 que funciona como uma protease cliva a proteína BlaI permitindo a transcrição do gene (89).

Algumas cepas de estafilococos produzem grandes quantidades de β -lactamase (hiperprodutoras) que rapidamente hidrolisam a penicilina este excesso de enzima pode ainda hidrolisar parcialmente as penicilinas resistentes as penicilinas (44).

O segundo mecanismo é mediado pela produção da PBP 2a que é uma enzima carboxipeptidase extra, cuja função é ligar resíduos de D-alanina do amino ácido terminal da cadeia lateral do ácido N-acetil murâmico do peptidoglicano. Esta nova proteína tem baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmico e é codificada pelo gene *mecA* (12), porém a resistência à penicilina não depende só da expressão desta nova enzima. O mecanismo é mais complexo e depende também da

expressão de altas concentrações de PBP2 sensível. Quando a meticilina inativa a PBP2, a PBP2a sozinha não pode sintetizar peptidoglicano funcional. Parece que o segundo domínio enzimático, sítio da transglicosilação da PBP2, nativa e bifuncional, é necessário para cooperar com a atividade de transpeptidase da PBP2a. O domínio da transglicosilação da PBP2 permanece funcional e ativo enquanto o domínio da transpeptidase é inativado pela meticilina (22, 59, 60, 66)

Outros mecanismos de resistência dos estafilococos aos β -lactâmicos já foram descritos, porém com menor importância clínica. São alguns fatores cromossômicos, cuja atividade afeta o nível da resistência, muitos destes genes estão envolvidos na biosíntese da parede celular (12,14). Como por exemplo, a hiperprodução da PBP4, esta enzima de baixo peso molecular, está envolvida em uma ligação cruzada secundária da cadeia de peptidoglicano. A PBP4 possui atividades de transpeptidase e DD-amino carboxipeptidase. A hiperprodução de PBP4 e ou PBP2, bem como mudanças na afinidade pelos antibióticos beta lactâmicos, aumenta a resistência intrínseca em cepas suscetíveis (19, 67).

Alguns genes independentes do locus *mec* contribuem para expressão da resistência aos β -lactâmicos. Estes genes designados *fem* (fatores essenciais para expressão da resistência) estão presentes no cromossomo de MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente) e MRS (*Staphylococcus spp* meticilina resistente) (18).

Dois destes genes *femA* e *femB*, não tem envolvimento na síntese da PBP2a, mas estão envolvidos na formação da ligação cruzada dos precursores da cadeia do peptidoglicano-pentaglicina. A disfunção do *femA* ou *femB* diminui o conteúdo

de glicina nos precursores do peptídeoglicano e confere susceptibilidade à metilina. A presença do *femA* é também necessária para o aumento da atividade autolítica observada nas cepas contendo *mecA* (2, 18).

Regulação da expressão gênica do gene *mecA* e interferência do operon *bla* das β -lactamases

A expressão gênica do gene *mecA* pode ter basicamente dois fenótipos de resistência, associados a diferenças na regulação, resultando em fenótipo induzível ou constitutivo. A PBP2a é induzível pela presença dos antibióticos beta lactâmicos, mas esta proteína também pode ser produzida constitutivamente (15).

O fenótipo induzível está associado à presença do plasmídio contendo o operon *bla* da β lactamase regulado pelos genes codificados pela penicilinase plasmidial. O fenótipo constitutivo ocorre quando há eliminação ou perda do plasmídeo ou da β -lactamase plasmidial convertendo a cepa de um fenótipo induzível para constitutivo (15).

Os estafilococos com fenótipo induzível contém um locus regulatório com os genes *mecI* e *mecRI*, que são homólogos aos genes reguladores *blaI* e *blaRI*, respectivamente e que regulam a produção de β -lactamases. Estudos têm demonstrado a capacidade do complexo *blaR1-blaI* em regular a expressão do gene *mecA*. Os genes reguladores *bla* ou *mec* podem ambos controlar a produção da PBP 2a e da β -lactamase devido ao alto grau de homologia dos dois sistemas (6, 35, 85).

Isolados que possuem uma disfunção na região regulatória, dos genes *mecI* e *mecRI*, podem expressar *mecA* constitutivamente. Mas, também podem usar os genes reguladores da β -lactamase para melhor expressar *mecA*, principalmente porque *BlaR1* é um forte indutor do *mecA* e *BlaI* é um fraco repressor. Entretanto a

regulação em isolados clínicos é feita principalmente pelos genes *bla* porque ocorrem deleções ou mutações no gene *mecl* que exerce atividade repressora. Estas cepas são clinicamente importantes porque elas são desreprimidas lentamente tornando a detecção da resistência difícil. São necessárias 48 horas para expressão total da resistência (1, 29, 89).

Resistência mediada pelo gene *mecA* e os cassetes *SCCmec*

O estudo da resistência a meticilina mediada pelo gene *mecA* não pode mais estar dissociado da análise dos tipos de elemento cromossômico móvel que contém este gene que é denominado *Staphylococcal chromossome cassette mec* (*SCCmec*). Este complexo gênico foi descoberto e elucidado recentemente. Atualmente são conhecidos seis tipos de *SCCmec*, os quais podem apresentar alguns subtipos (28, 33, 54). Os *SCCmec* têm importância fundamental na transmissão da resistência e na epidemiologia da bactéria. Inicialmente este cassete cromossômico era denominado como uma ilha de resistência, porém não se pode limitar a função deste elemento cromossômico à transferência da resistência aos β -lactâmicos. Parece que o *SCCmec* serve como veículo para trocas úteis a uma melhor sobrevivência dos estafilococos em vários ambientes, além de conter também genes de resistência a outros antibióticos e outros genes e pseudogenes que codificam enzimas com diversas funções (20, 25).

Estudos de Ito e colaboradores descreveram todo elemento o *SCCmec*, ainda conhecido como DNA *mec*, em uma cepa de MSSA a N315, nomeada como pré-MRSA. Esta cepa, apesar de apresentar o gene *mecA*, era sensível à meticilina. A explicação deste fato é que a expressão do gene *mecA* estava fortemente reprimida na cepa N315 pelo produto de um gene regulador denominado *mecl* (24, 26).

Com a evolução das técnicas de clonagem e sequenciamento toda região do cromossomo em torno do gene *mecA*, em poucos anos, foi analisada, descrita e

classificada. Foram encontradas duas regiões essenciais e comuns a todos os estafilococos resistentes à metilina. Estas regiões foram denominadas como complexo do gene *mec* e complexo do gene *ccr*. As seqüências entre os complexos ou depois deles foram classificadas como regiões “junkyard” (sobras) ou região J (29, 30).

Descrição do complexo do gene *mec*

Quatro classes principais do complexo do gene *mec* foram identificadas com o uso de primers específicos através da técnica de PCR utilizando o DNA cromossômico, de cepas de várias espécies de estafilococos meticilina resistente, como alvo (29). O complexo *mec* contém os genes reguladores da expressão do gene *mecA*, que são o *mecI* e *mecR1*. Estes genes reguladores também estão situados no elemento *SCCmec* do cromossomo bacteriano, logo após o promotor do gene *mecA*. Estes genes podem estar íntegros ou truncados (Δ *mecR1*) esta característica pode estar associada a alterações estruturais do complexo *mec* que ocorreram pelo movimento ou inclusão de seqüências de inserção (IS) (29).

O gene *mecR1* codifica um indutor transmembrana do *mecA* constituído dos domínios atravessador de membrana (MS) e ligador de penicilina (PB) (85). Estudos na região *mecR1* e *mecI* têm mostrado que há uma considerável diversidade genômica no complexo *mec* (Figura 1). O complexo classe A possui os genes *mecR1* e *mecI* intactos: **classe A- IS431-*mecI*-*mecR1*- *mecA* -IS431**. No complexo classe B o domínio PB do *mecR1* e o gene completo *mecI* estão truncados por uma cópia parcial de IS1272: **classe B – IS1272- Δ *mecR1*-*mecA*-IS431**. O complexo classe C tem duas variantes, C1 e C2. No complexo classe C1, o domínio PB do *mecR1* e o *mecI* inteiro estão truncados pelo IS431, e no complexo classe C2, ambos os domínios MS e PB do *mecR1* bem como o *mecI* estão truncados por IS431: **classe C-IS431 - Δ *mecR1*- *mecA* IS431**. No complexo classe D, *mecI* está

deletado e o domínio PB do *mecR1* está truncado: classe ***D-ΔmecR1- mecA -IS431*** (28, 35).

Dickinson e Archer demonstraram que em algumas cepas de *S. epidermidis*, com a seqüência intacta do gene *mecI*, apresentavam baixos níveis de resistência à meticilina. Seus experimentos também sugerem que a inativação por deleção (ou mutação *in vivo*) do gene *mecI* pode tornar a cepa capaz de expressar altos níveis de resistência à meticilina, indicando claramente o papel do gene *mecI* na repressão da resistência (8, 73). Além disso, o complexo do gene *mec* contém a seqüência de inserção IS431 descrita como um sítio para depósito de múltiplos genes de resistência (25, 29).

Caracterizou-se que os *S. haemolyticus* tem uma cópia da estrutura IS431, chamada IS431L, localizada acima do complexo *mec* (Figura 1, segundo exemplo). A estrutura total IS431-*mecA*-IS431 lembra a estrutura de um transposon, mas não há evidências para sustentar esta hipótese. Entre os SCoN esta estrutura é reconhecida preferencialmente em isolados *S. haemolyticus*, porém não é exclusiva desta espécie, pois já foi identificada em *Staphylococcus sciuri* (29).

O gene *mecA* apresenta altos níveis de homologia entre as espécies de MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente) e de MR-SCoN. Sua origem ainda é obscura. Um gene *mecA* homólogo com 88% de similaridade entre os 37 aminoácidos com o gene *mecA* dos estafilococos meticilina resistentes foi identificado no *Staphylococcus sciuri*. Um fato interessante é que este gene homólogo é ubíquo nesta espécie, mas seu genótipo é sensível. Este e outros dados sustentam a hipótese de que o gene *mecA* é originário de espécies de SCoN, possivelmente uma espécie evolucionariamente próxima do *S. sciuri* (6).

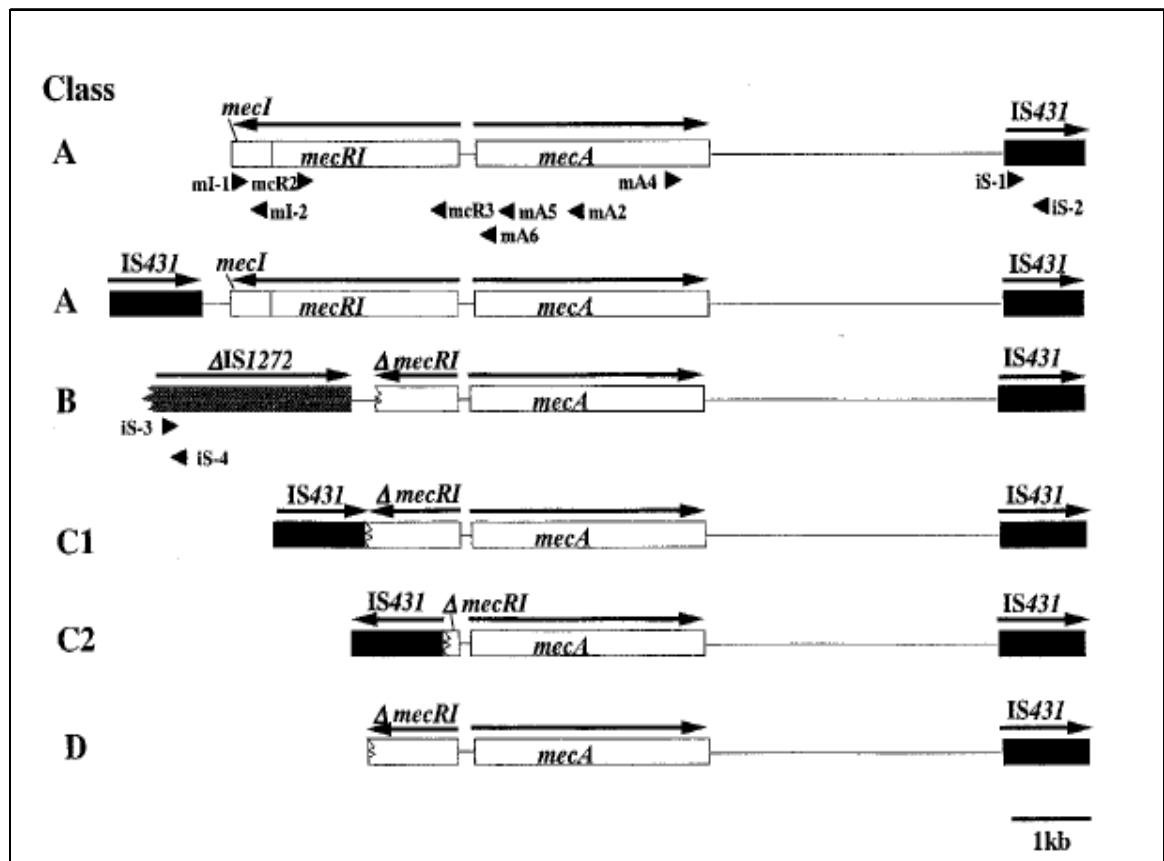


FIGURA 1. Organização genética do complexo *mec* em estafilococos e suas diferentes classes. FONTE: KATAYAMA, Y; ITO, T e HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS 431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low level methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v 45, 1955-1963, 2001

Descrição do complexo dos genes *ccr*

A outra região gênica que é comum a todos os *SCCmec* é o complexo do gene *ccr* que codifica as enzimas recombinases (*ccrA* e *ccrB* ou *ccrC*). A função destas enzimas é garantir a mobilidade dos *SCCmec* excisando precisamente o elemento do cromossomo e integrando em um sítio específico de um cromossomo receptor. O *SCCmec* é integrado no genoma no sítio *attB_{SCC}* localizado na *ofrX*, uma seqüência aberta de leitura (OFR) com função desconhecida (16, 25, 27, 31).

O complexo do gene *ccr* é composto por quatro tipos de gene de cada enzima recombinase. A enzima *ccrA* do complexo apresenta os alótipos: *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* e *ccrA4*; e a enzima *ccrB* os alótipos *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* e *ccrB4*. Os tipos de *SCCmec* são classificados de acordo com a combinação entre o complexo do gene *mecA* e o complexo do gene *ccr*. Os principais tipos de *SCCmec* apresentam as seguintes combinações:

SCCmec tipo I, complexo do gene *mec* classe B e complexo do gene *ccr 1* (*ccrAB1*);

SCCmec tipo II, complexo do gene *mec* classe A e complexo do gene *ccr 2* (*ccrAB2*), (Figura 2);

SCCmec tipo III, complexo do gene *mec* classe A e complexo do gene *ccr 3* (*ccrAB3*),

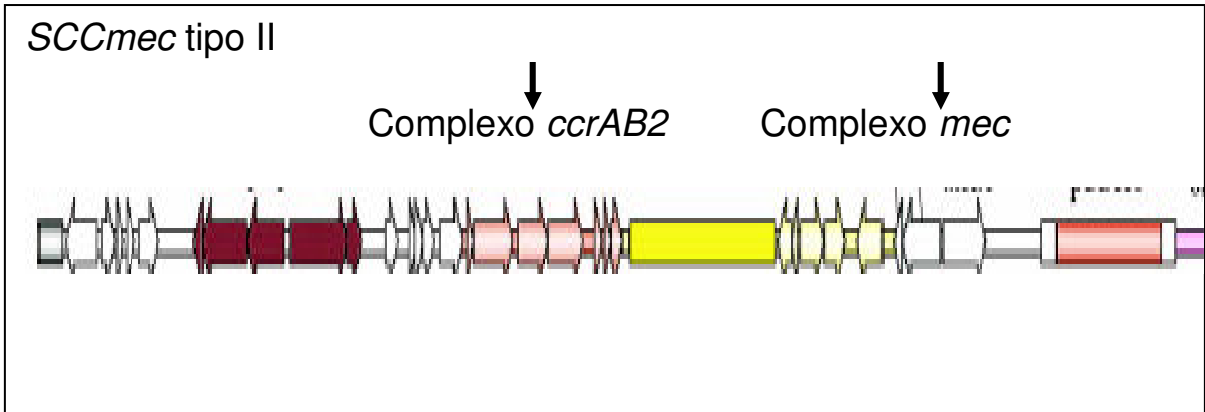
SCCmec tipo IV, complexo do gene *mec* classe B e complexo do gene *ccr 2* (*ccrAB2*),

SCCmec tipo V, complexo do gene *mec* classe C e complexo do gene *ccrC*

SCCmec tipo VI, complexo do gene *mec* classe B e complexo do gene *ccr 4* (*ccrAB4*), (25, 27, 30, 33, 37, 54).

Finalmente cada *SCCmec* é classificado em subtipos baseado na constituição da seqüência das regiões J que não pertence ao complexo do gene *mec* nem ao complexo do gene *ccr* (25, 27, 30, 37).

Experimentos demonstraram que os genes das recombinases codificados no elemento *SCCmec*, *ccrA* e *ccrB* são suficientes para transferir o elemento de um plasmídeo para o cromossomo em um sitio específico e com orientação específica (30). No entanto o mecanismo preciso da transferência do *SCCmec* na natureza ainda é desconhecido (63).



do complexo *ccr* (rosa) e do complexo *mec* (branco) Fonte Adaptado de Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. J Clin Microbiol. 2005 Jul; 43(7): 3364-72.

Estrutura dos principais tipos de *SCCmec*

Até o momento seis principais tipos de *SCCmec* foram descritos. Os elementos *SCCmec* tipos I, II, III e VI estão mais associados a infecções causadas por estafilococos de origem nosocomiais, enquanto que os tipo IV e V são encontrados com maior freqüência em estafilococos de infecções comunitárias (21, 33).

Estudos de Ito e colaboradores elucidaram a estrutura completa dos três maiores tipos de *SCCmec*. O tipo I (34Kb) foi identificado na primeira cepa de MRSA isolado em 1961 no Reino Unido (cepa NCTC104442). O tipo II (52Kb) foi identificado em uma cepa PRE-MRSA isolada no Japão em 1982 (cepa N315), e o tipo III (66Kb) foi identificados em uma cepa MRSA isolada em 1985 na Nova Zelândia (25, 26). Mais recentemente foi identificado um quarto elemento *SCCmec* tipo IV, (20 a 24Kb) isolado do Clone Pediátrico de um MRSA adquirido da comunidade. O *SCCmec* tipo V (28 Kb) foi isolado na Austrália da cepa WIS [WBG8318] de um MRSA comunitário (27). Em todos os tipos de *SCCmec* estudados, a seqüência do gene *mecA* é altamente conservada, sejam cepas de *S. aureus* ou de *Staphylococcus spp* coagulase negativa (37, 85). O *SCCmec* tipo VI, isolado de uma cepa MRSA do Clone pediátrico, a cepa HDE288. Contém o complexo *ccrAB4* e o complexo *mec* classe B. Esta cepa é dominante nos hospitais de Portugal, porém ainda é pouco descrita (33, 54).

A observação de que o elemento menor, *SCCmec* tipo IV, pode ser adquirido mais freqüentemente pode ser explicado porque a eficiência da transferência é

maior quanto menor o DNA. Hiramatsu e colaboradores (2001) sugerem que o *SCCmec* tipo IV tem um baixo custo metabólico para transferência, pois carrega apenas as recombinases e os genes que regulam a expressão do *mecA*. A combinação entre o pequeno tamanho do DNA e o baixo custo metabólico torna o *SCCmec* tipo IV um elemento seletivamente favorecido para transferência entre os *Staphylococcus* spp (25). Esta observação sugere que a prevalência de doenças causadas por clones que contém o *SCCmec* tipo IV tende a aumentar. Se considerarmos que o *SCCmec* tipo V apresenta as mesmas vantagens seletivas do *SCCmec* tipo IV, podemos inferir que a sua presença nas infecções comunitárias também se tornem cada vez mais freqüentes. Em contraste os *SCCmec* tipos II e III podem carregar genes adicionais como os que codificam a resistência aos antibióticos não β lactâmicos e metais pesados (52, 63).

Tabela 1. Descrição dos tipos I a VI de *SCCmec*

SCCmec	Cepa^a	Origem ou Descrição	Tamanho	Complexo <i>ccr</i>	Complexo <i>mec</i>
Tipo I	MRSA NCTC 104442 ^b	Reino Unido, 1961	34 kb	<i>ccrAB1</i>	Classe B
Tipo II	Pré-MRSA N315 ^c	Japão, 1982	52 kb	<i>ccrAB2</i>	Classe A
Tipo III	MRSA 85/2082 ^d	Nova Zelândia, 1985	66 kb	<i>ccrAB3</i>	Classe A
Tipo IV	MRSA CA05 ^e	Estados Unidos, 2001	20-24 kb	<i>ccrAB2</i>	Classe B
Tipo V	WIS [WBG8318] ^f	Austrália, 2002	28 kb	<i>ccrC</i>	Classe C
Tipo VI	HDE288 ^g	Portugal, 1992	~25 Kb	<i>ccrAB4</i>	Classe B

^a Cepas de referência de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA)

^b Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB033763 *National collection of type cultures* (NTTC)

^c Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank D86934

^d Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB037671

^e Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB063172

^f Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB121219 C-MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente comunitário metilina resistente comunitário)

^g Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AF11935

A resistência codificada nos *SCCmec* e descrição atual

O *SCCmec* tipo I não contém outra resistência a antimicrobianos além dos β -lactâmicos. Porém uma ORF (*open reading frame*) codifica uma proteína de superfície plasmina-sensível que pode ser danosa às células hospedeiras porque interfere na propriedade de ligação da fibronectina e do fibrinogênio (81).

Os dois maiores elementos *SCCmec*, tipo II e tipo III têm a estrutura mais variável, isto pode ser explicado pelo fato de que estes elementos contêm mais cópias das seqüências de repetição IS431 e do transpososomo Tn544. A atividade destes dois elementos pode ter um papel importante na remodelação da estrutura do *SCCmec* e levar a um maior número de variantes estruturais. Isolados recentes de MRSA são resistentes a muitos antibióticos além dos β -lactâmicos (25, 29).

O *SCCmec* tipo II o segundo maior elemento gênico tem codificado a esquerda do complexo *mec* uma cópia do transpososomo Tn554 onde está inserido o gene *spc* que codifica a resistência a espectinomicina, e o gene *ermA*, que codifica a resistência a macrolídeos, lincosaminas e streptogramíneas (MLS). À direita do complexo *mec* está integrada uma cópia do plasmídeo pBU110 com os genes para resistência a kanamicina e tobramicina (*aadD*) e para bleomicina (*ble*) um anticarcinogênico. Shore e colaboradores (2005) identificaram seis variantes do *SCCmec* tipo II (26, 68) (Tabela 2).

Entre os elementos gênicos o maior, mais complexo e que codifica o maior número de genes de resistência e, portanto o mais virulento é o *SCCmec* tipo III. O *SCCmec* III contém um plasmídeo pequeno, à direita do gene *mecA*, o pT181, e

neste plasmídeo o gene *tetK* que codifica a proteína que promove o efluxo da tetraciclina. Ao lado deste plasmídeo, outro denominado pT258 que é pouco descrito (53). Foi também identificado à esquerda do gene *mecA*, o transposon Tn554, neste transposon ainda encontram-se os genes para resistência aos MLS e o gene *spc*. À direita do gene *mecA* encontra-se o ψ Tn554 (é um pseudo transposomo, pois não possui as transposases *tnpA* e *tnpB*) que codifica a resistência ao cádmio através do gene *cadC*. Além destes genes, o operon do mercúrio também está presente conferindo resistência à bactéria para este metal pesado (28) (Tabela 3). O *SCCmec* tipo III é subdividido em tipo IIIa e IIIb, o primeiro difere do tipo *SCCmec* III pela ausência do pT181 e seus elementos IS431. O *SCCmec* tipo IIIb não apresenta integradas cópias de Tn554, pT181 e do operon *mer* com suas seqüências de inserção associadas (28, 53).

O *SCCmec* tipo IV tem uma nova combinação do complexo *mec* e do complexo *ccr 2*, muito menor que os *SCCmec* descritos anteriormente. Ambos *SCCmec* I e IV têm o complexo *mec* com a seqüência de inserção IS1272 inserida no mesmo ponto de junção, isto sugere que a recombinação ocorreu entre o *SCCmec* I e outras seqüências para gerar o *SCCmec* tipo IV, porém o complexo *ccr* tem maior identidade com o complexo *ccr 2* característico do *SCCmec* tipo II (37).

O *SCCmec* tipo V, não codifica outra resistência além do gene *mecA*, porém já foram descritos MRSA multiresistentes com este tipo de elemento genético (50). O *SCCmec* tipo V codifica um gene de uma nova recombinase, responsável por sua mobilidade, a *ccrC*, mas com uma única cópia do gene, diferente dos outros tipos de *SCCmec* que têm duas recombinases. Entretanto, neste elemento novo, está

codificado um sistema de restrição modificado que pode ter importância na estabilização do elemento no cromossomo (27). O tipo VI recentemente descrito é um elemento menor, porém identificado em cepas nosocomiais. Sua estrutura se resume ao complexo *ccrAB2* e ao complexo *mec* tipo B. A única resistência codificada neste tipo de *SCCmec* é aos antibióticos β -lactâmicos (54) (Figura 2).

Boyle-Vavra e colaboradores (2005) descreveram um novo subtipo de *SCCmec* tipo V designado como *SCCmec* V_T, contendo uma nova variante de *ccrC* (*ccrC2*), os mesmos autores também detectaram um novo *SCCmec* que contém todas as características do *SCCmec* IV e também a *ccrC* (4).

As cepas comunitárias têm vantagens seletivas como ter uma taxa de crescimento mais alta que as cepas nosocomiais e são mais aptas a colonizar humanos do que aquelas com fenótipo de multiresistência (37).

Os *Staphylococcus* spp comunitários, principalmente os *S. aureus* comunitários meticilina resistentes (C-MRSA) tornaram-se, nos últimos anos, de grande importância nos EUA, Austrália, países da Europa e América Latina (21, 50, 56, 62, 88). Algumas cepas podem conter o gene de virulência *Panton-Valentine leucocidin* (PVL) que pode causar pneumonia necrotizante, sepse severa entre outras infecções graves (4, 77).

Notadamente o diagnóstico rápido das infecções nosocomiais e comunitárias causadas por estas bactérias é importante pela gravidade das doenças que desenvolvem o que se torna difícil, pela grande plasticidade do genoma dos *Staphylococcus* spp comprovada pela grande diversidade de *SCCmec* detectada em isolados clínicos.

Tabela 2. Elementos genéticos associados à resistência do *SCCmec* tipo II.

Elementos genéticos	Genes de Resistência	Função
Tn554	<i>ermA</i>	Resistência MLS ^a
	<i>spc</i>	Resistência a espectinomicina
pUB110	<i>aadD</i>	Resistência tobra. e kanamicina
	<i>ble</i>	Resistência a bleomicina
complexo <i>mec</i>	<i>mecA</i>	Resistência aos β lactâmicos

^a Resistência a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas

Tabela 3. Elementos genéticos associados à resistência do *SCCmec* tipo III.

Elementos genéticos	Genes de Resistência	Função
Tn554	<i>ermA</i>	Resistência MLS ^a
	<i>spc</i>	Resistência a espectinomicina
<i>mer</i> operon	<i>mer</i>	Resistência ao mercúrio
pT181	<i>tetK</i>	Efluxo da tetraciclina
complexo <i>mec</i>	<i>mecA</i>	Resistência aos β lactâmicos
ψ TN554	<i>cad</i>	Resistência ao cádmio

^a Resistência a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas

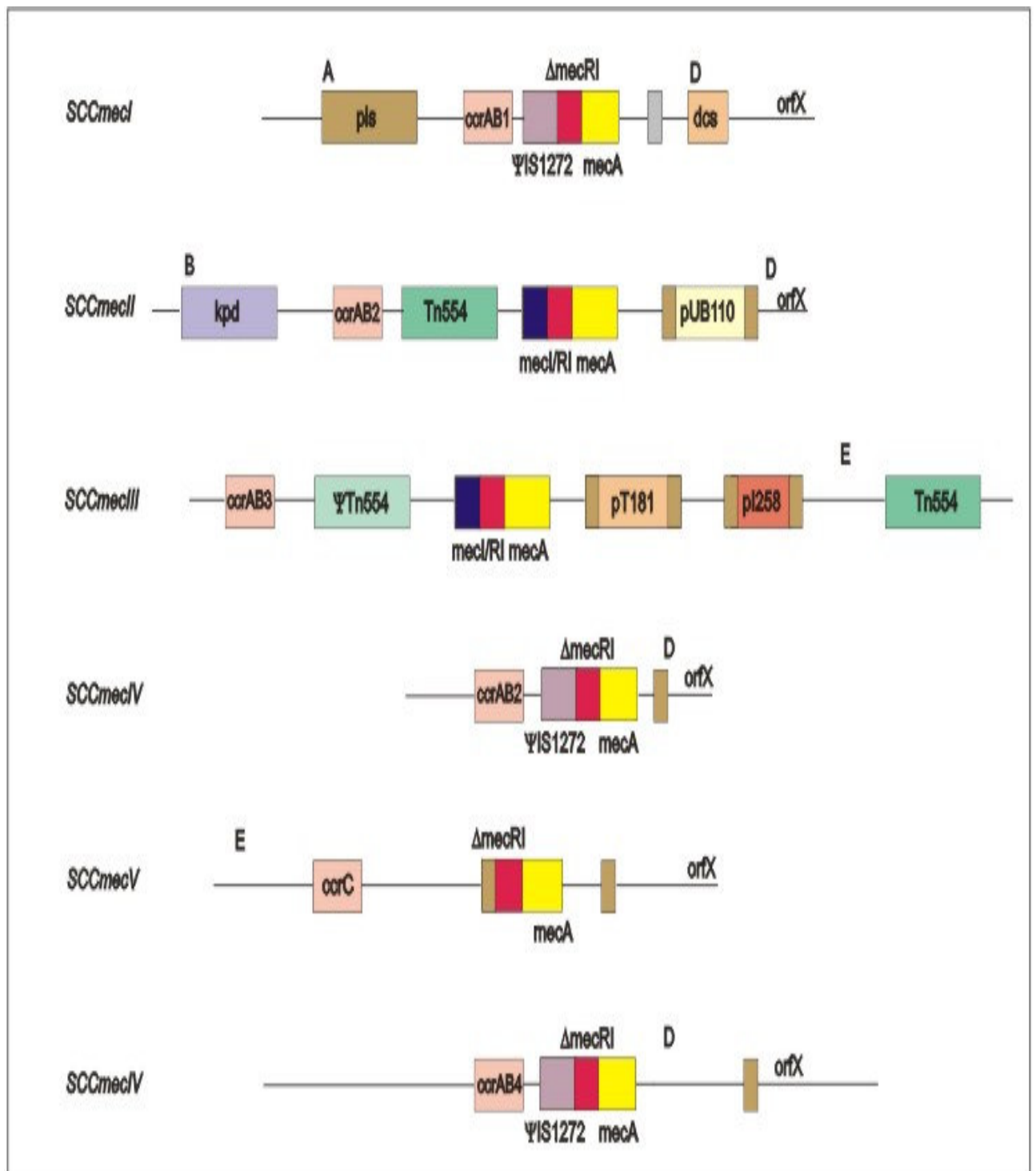


FIG.3. Representação esquemática dos SCCmec I a VI com os principais elementos gênicos (*ccr*, IS431, IS1272, *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *orfX*, pI258, pT181, pUB10 e Tn554) e com os quatro lócus A, B, D e E, indicados pelas letras, utilizados para identificação dos tipos de SCCmec. Fonte: Deurenberg RH, Vink C, Oudhuis GJ, Mooij JE, Driessen C, Coppens G, Craeghs J, De Brauwere E, Lemmen S, Wagenvoort H, Friedrich AW, Scheres J, Stobberingh EE. Different clonal complexes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine region. *Antimicrob Agents Chemother.*2005Oct;49(10):4263-71

Métodos de detecção da Resistência à Meticilina

Nos *Staphylococcus spp coagulase* negativa resistentes à metilina a expressão da proteína PBP2', muitas vezes, é heterogênea, devido a complexidade dos mecanismos de expressão, dificultando sua detecção por métodos fenotípicos. A detecção genotípica do gene *mecA* por PCR é considerada o padrão ouro. Nos casos de infecções severas, é clinicamente útil detectar rapidamente a suscetibilidade e identificação da bactéria (5, 23, 39, 41). Poucos laboratórios, entretanto, têm a técnica e a capacidade econômica para aplicar testes de PCR em todos isolados de estafilococos, então, o teste de disco difusão permanece sendo o método de escolha para detectar a resistência à metilina (49). O ideal, para detecção rápida e acurada da sensibilidade ou resistência é que se combinem os métodos fenotípicos e genotípico (71).

Na população heteroresistente, tipicamente 99,9% das bactérias são suscetíveis a baixas concentrações de antibióticos β -lactâmicos (1 a 5 $\mu\text{g/mL}$ de metilina), e uma pequena proporção de células cresce em altas concentrações de metilina ($\geq 50 \mu\text{g/mL}$). O nível de expressão da resistência varia de acordo com as condições da cultura e com o tempo de utilização dos antibióticos β -lactâmicos. A maioria dos isolados clínicos exibe melhor este padrão de heteroresistência sob condições de cultura hipertônica (suplementada com NaCl) e incubada a 35°C por 24 horas (5, 6).

Com a intenção de aumentar a sensibilidade do teste de detecção dos isolados de *Staphylococcus* spp coagulase negativa resistentes à meticilina, o CLSI/NCCLS recomendou a redução do breakpoint de oxacilina para a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de ≥ 4 para $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ (46).

Quando Monsen e Tenover testaram o novo ponto de corte para oxacilina preconizado pelo CLSI/NCCLS os resultados indicaram que para triagem da resistência o novo *breakpoint* é melhor quando correlacionado com o padrão ouro de detecção do gene *mecA*, a PCR. Mas segundo Tenover os resultados da MIC e do teste de disco difusão embora consistentes entre si, ainda falham em detectar SCoN sensíveis a meticilina com exceção *S. epidermidis*, que não possuem o gene *mecA* (45, 79).

O teste de aglutinação em látex para detecção da proteína PBP 2a, produto da expressão do gene *mecA*, foi recomendado para caracterização de isolados de SCoN resistentes a meticilina outros que não *S. epidermidis* envolvidos em infecções de sítios estéreis no documento do CLSI/NCCLS em 2002. Essa foi a alternativa apresentada para os laboratórios que não possuem a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* (47).

O teste de aglutinação em látex também pode ser utilizado como método diagnóstico, porém modificações na técnica são necessárias para se obter resultados mais consistentes. Foi testada e confirmada a necessidade da indução da expressão do gene *mecA*, expondo a bactéria a um disco de oxacilina de 1 μg na semeadura primária. Também foi alterado o inóculo, utilizando-se quantidade maior de bactérias que as especificações do teste. Para melhorar a sensibilidade do teste

de 68% para 95,7% foi aumentando o tempo do teste de 3 minutos para 10 minutos. Estas modificações podem induzir resultados falsos positivos e devem ser utilizadas com cautela (75).

Para melhorar a sensibilidade do teste de disco difusão o CLSI/NCCLS a partir de janeiro de 2004 recomendou o uso do disco de cefoxitina para detectar a resistência à meticilina. O teste de disco difusão é feito nas condições usuais da determinação do antibiograma. Segundo o CLSI/NCCLS, prediz melhor a presença do gene *mecA* do que o teste com o disco de oxacilina realizado anteriormente. A cefoxitina é um indutor mais eficiente do *mecR1* do que a oxacilina ou meticilina (2, 48). O teste com a cefoxitina parece ter melhor sensibilidade em relação à presença ou não do gene *mecA*, para todos os *Staphylococcus* spp e com uma vantagem para os *S. aureus* (61, 74,79). A precisão e a rapidez na detecção da resistência à meticilina em estafilococos é importante para o controle endêmico dos MRSA e MR-SCoN conseqüentemente implicando no sucesso do controle de infecção hospitalar (71).

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Determinar a prevalência da resistência à meticilina nos *Staphylococcus* spp coagulase negativa, mediada pelo gene *mecA*, em isolados de hemocultura de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Comparar a eficiência (sensibilidade e especificidade) dos métodos de disco difusão de oxacilina com o disco difusão de cefoxitina, para diagnóstico da resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp coagulase negativa, utilizando a detecção do gene *mecA* como padrão ouro (PCR).

Objetivos específicos

Identificar na população dos SCoN que apresentam o gene *mecA* os tipos de *SCCmec* (tipos I, II, III e IV).

Identificar as espécies dos SCoN e relacionar a distribuição do gene *mecA* para estabelecer correlação entre espécie e resistência a meticilina.

Comparar os testes de suscetibilidade aos antibióticos não β -lactâmicos dos SCoN com gene *mecA* (resistentes à meticilina) com os testes dos SCoN sem o gene *mecA* (sensíveis à meticilina).

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- 1) Bannerman, T. M. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2003, p.384-403.
- 2) Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol 2002; 178(3):165-71.
- 3) Blair JE. The pathogenic staphylococci. Bacteriol Rev 1939; 3(1):97-146.
- 4) Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV J Clin Microbiol. 2005; 43(9):4719-30.
- 5) Brown DFJ. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. Journal Antimicrob. Chemother 2001; 48: S1, 65-70.
- 6) Chambers, HF. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Reviews. 1997; 10: 781-791.

- 7) Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolino M, Bouza, E., and Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*... Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 4240-4245.
- 8) Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(6):1616-23.
- 9) Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:S114-S132.
- 10) Favre B, Hugonnet S, Correa L, Sax H, Rohner P, Pittet D. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 697-702.

- 11) Garcia-Castellanos R, Mallorqui-Fernandez G, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis-Ruth FX. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: Mecl repressor in complex with its operator. *J Biol Chem.* 2004; 279(17): 17888-96.
- 12) Giesbrecht P, Kersten T, Maidho H, Wecke J, Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(4): 1371-1414.
- 13) Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 2005; 187(7): 2426-38.
- 14) Gustafson JE, Berger-Bach B, Strassle A, Wilkinson BJ. Autolysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(3): 566-72.
- 15) Hackbarth CJ, Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(7): 991-4.

- 16) Hanssen A-M, Kjeldesen G, Sollid JUE, Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2004; 48: 1- 285-296.

- 17) Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol.* 1997; 24(5): 1013-24.

- 18) Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bachi B. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1993; 75 (6):1612-20.

- 19) Henze U, Berger-Bachi B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(9):2121-5.

- 20) Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, Baba T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine.* 2004; 6; 22 Suppl 1:S5-8.

- 21) Hisata, K., Kuwahara-Arai, K., Yamamoto, M., Ito, T., Nakatomi, Y., Cui, L., et al. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3364-3372.
- 22) Holtje JV. The alternative to penicillins. *Nat Med.* 2001; 10:1100-1
- 23) Hussain Z, Stoakes, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, Sayed SEL, Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:752-754.
- 24) Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J.* 1998; 39(6):526-33.
- 25) Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimito K, Tiensasitorn C, Hiramatsu, K. Structural Comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2001; 45: 5- 1323-336.
- 26) 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 and Chemother.* 1999; 43: 6- 1449-1458.

- 27) Ito T, Ma XX, Takeuchi, F, Okuma K, Yazawa H, Hiramatsu K. Novel type Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 2637-2651.
- 28) Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003; 6: 41-52. Review.
- 29) Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(7):1955-63.
- 30) 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* 2000; 44: 1549-1555.
- 31) Katayama Y, Takeuchi F, Ito T, Ma XX, Ui-Mizutani Y, Kobayashi I, Hiramatsu K Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2003; 185(9):2711-22.

- 32) Kathib R, Reiderer KM, Klark JA, Kathib S, Briskl LE, Wilson FM. Coagulase-negative Staphylococci in multiple blood cultures: strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. J. Clin Microbio. 1995. 33:816-820.
- 33) Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe, S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 264-74.
- 34) Koneman E W, Allen S D, Janda W., Schreckenberger P C, Winn WCJ. The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organisms. In: Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. J, editors. Atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, USA: Lippincott, 1997; 539-576.
- 35) Lim TT, Coombs GW, Grubb WB. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. J Antimicrob Chemother. 2002. 50(6):819-24.
- 36) Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol Rev. 1987; 51(1):88-134. Review.

- 37) Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(4):1147-52.
- 38) Mack D, Sabottke A, Dobinsky S, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch KM. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* Transposon mutant classes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1, 178-183.
- 39) Maes N, Magdalena J, Rottiers S, Gheldre Y, Struelens MJ. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *J. Clin. Microb.* 2002; 40 (4): 1514-1517.
- 40) Maki H, Murakami K. Formation of potent hybrid promoters of the mutant *l/m* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1997; 179(22):6944-6948
- 41) Martineau F, Picard FJ., Lansac N, Ménard C, Roy PH, Oullette M, Bergeron MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* . *Antimicrobial Agents and Chemother.* 2000; 44: 231-238.

- 42) Mateo M, Maestre JR, Aguilar L, Cafini F, Puente P, Sanchez P, Alou L, Gimenez MJ, Prieto J. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(2): 287-91.
- 43) Matias VR, Beveridge TJ. Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2006; 188(3):1011-21.
- 44).McDougal LK, Thornsberry C The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol. 1986; 23(5):832-9.
- 45) Monsen T, Add H, Leonardson K, Edebro H, Wiström J. Prediction of *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci: assessment of different phenotypic methods, breakpoints, culture media and culture conditions. J. Antimicrob. Chemother. 2002; 49:197-200.
- 46) NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1999). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninth International Supplement M100-S9. NCCLS, Wayne Pennsylvania, USA.
- 47) NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002. Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility testing; Twelfth

information supplement. NCCLS document M100-S12, Wayne Pennsylvania, USA.

48) NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2004. Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility testing; Fourteenth information supplement. NCCLS document M100-S14, Wayne Pennsylvania, USA.

49) CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2006. Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility testing; 16th information supplement. NCCLS document M100-S16, Wayne Pennsylvania, USA.

50) O'Brien FG, Coombs GW, Pearson JC, Christiansen KJ, Grubb WB. Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(12):5129-32.

51) O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 2001; 50(7):582-7. Review.

52) Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. of Clin. Microbiol.* 2002; 40: 11, 4289-4294.

- 53) Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(7): 2155-61.
- 54) Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3457-3459.2006.
- 55) Patel R, Piper KE, Rouse MS, Uhl JR, Cockerill FR 3rd, Steckelberg JM. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20 - year experience. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: (11) 4262-4263.
- 56) Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(7):1762-70.
- 57) Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial

- Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 33(4):283-97.
- 58) Picazo JJ, Betriu C, Rodriguez-Avial I, Culebras E, Gomez M, Lopez F; Grupo VIRA. [Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006] *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24(10): 617-28. Spanish
- 59) Pinho MG, DE Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 11; 98(19):10886-91.
- 60) Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2001; 183(22):6525-31.
- 61) Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 51(1):57-62.
- 62) Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First report of infection with

- community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005; 43(4):1985-8.
- 63) Robinson DA, Enright MC, Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 3926-3934.
- 64) Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis. 2004; 8(1):25-79.
- 65) Sader, H.S.; Streit, J.M.; Fritsche, T.R.; Jones, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). Clin Microbiol Infect. 2004; 12(9):844-52.
- 66) Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol Mol Biol Rev. 2005; 69(4):585-607.
- 67) Schrader-Fischer G, Berger-Bachi B. The AbcA transporter of *Staphylococcus aureus* affects cell autolysis. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(2):407-12.

- 68) Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5):2070-83.
- 69) Silva GDI, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2):382-8.
- 70) Silva HL, Strabelli TM, Cunha ER, Neves SF, Camargo LF, UIP DE. Nosocomial coagulase negative staphylococci bacteremia: five years prospective data collection. *Braz J. Infect Dis.* 2000; 4:271-274.
- 71) Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Fridmont-Moller N, Olsson-Liljequist BE, Kahlmeter G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 46(3): 879-881.
- 72) Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9: 1179-1186.

- 73) Suzuki E, Kuwahara-Ari K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(6): 1219-1226.
- 74) Swenson JM, Tenover FC, Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):3818-23.
- 75) Swenson J, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:3785-3788.
- 76) Tabe Y, Nakamura A, Oguri T, Igari J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 32(3):177-83.
- 77) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, et al. A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7):3356-63.

- 78) Tan TY, Ng SY, Ng WX. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9):3413-4.
- 79) Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(12):4051-8.
- 80) Van Hoovels LDE, Munter P, Colaert J, Surmont , Van Wijngaerden E, Peetermans WE, Verhaegen J. Three cases of destructive native valve endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24(2):149-52.
- 81) Vaudaux PE, Monzillo V, Francois P, Lew DP, Foster TJ, Berger-Bachi B. Introduction of the mec element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters in vitro functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(3):564-70.
- 82) Viedma DG, Martin Rabadan P, Diaz M, Cercenado E, Bouza E. Heterogeneous antimicrobial resistance patterns in polyclonal populations of coagulase-negative staphylococci isolated from catheters. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: (4)1359-1363.

- 83) Villari P, Sarnataro C, Lacuzio L. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. 2000. J Clin. Microbio. 38: 1740-1454.
- 84) Von Eiff C, Heilmann, C, Peters, G. 1999. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 18(12):843-6. Review.
- 85) Weller TMA. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. J. Antimicrob. Chemother. 1999; 43: 15-22.
- 86) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39: 309-317.
- 87) Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing *SCCmec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3574-3579.

- 88) Witte W, Cuny C, Strommenger B, Bräulke C, Heuck D. Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. Euro Surveill. 2004; 9(1):16-8.
- 89) Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. Science 2001; 291:1962–1965.

Are there discrepancies between the detection *mecA* gene in coagulase-negative staphylococci by PCR and by cefoxitin and oxacillin disc? What's the role of β -lactamase hyperproduction in methicillin resistance?

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado* , Keli Cristine Reiter, Rodrigo Minuto Paiva, Afonso Luis Barth

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Running Title: Resistance to methicillin in SCoN

* Corresponding author. Mailing address:

Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular
Rua Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre – RS
Brasil -90.035.-903

Phone/FAX: +55 5121018860

E-mail: abmachado@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are a common cause of nosocomial infections and they have the tendency to develop resistance to methicillin (MR-SCoN) and to multiple antibiotics. Moreover the resistance to methicillin may not be easily detected by conventional susceptibility methods. The MR-CoNS are considered resistant to all β -lactamics antibiotics. This prospective study was aimed to determine the prevalence of *mecA* gene and the efficiency of the cefoxitin and oxacillin disk diffusion test to characterize the methicillin resistance mediated by the gene *mecA* in CoNS. The *mecA* gene distribution among the species of CoNS isolates and the antimicrobial resistance profile were also characterized. A total of 181 CoNS from bloodstream culture were analyzed and the global prevalence of *mecA* gene was 71.3%. The sensitivity of oxacillin and cefoxitin disks for all CoNS species was 100% and 98.4% respectively, whereas the specificity was 93% and 89.3 %. It was not possible to detect *mecA* gene in four (2.2%) isolates which were resistant to both cefoxitin and oxacillin. These isolates regained methicillin sensitive in the presence of clavulanic acid. Among the CoNS the commonest species was the *S. epidermidis* which 64% of the isolates followed by *S. hominis* 10%, *S. haemolyticus* 8.8% and *S. capitis* 7.7%. The percentage of *mecA*-positive isolates was highest for *S. haemolyticus* (93.8%), followed by *S. epidermidis* (75%) and *S. hominis* (72.2%). The MR-CoNS showed higher level of resistance to all non beta-lactamics antimicrobials as compared to methicillin sensitive CoNS and the difference were statistically significant except in regard to doxycycline.

Keywords: Coagulase negative staphylococci, methicillin resistant, PCR, antimicrobial profile

Há discrepâncias entre a detecção do gene *mecA* nos *Staphylococcus* spp coagulase negativa por PCR e por disco difusão com cefoxitina? Qual o envolvimento da hiperprodução de β -lactamase na resistência à meticilina?

RESUMO

Os estafilococos coagulase-negativa (SCoN) são causa comum de bacteremias nosocomiais e tem a tendência de desenvolver resistência a meticilina (MR-SCoN) e a múltiplos antibióticos. Os MR-SCoN são considerados resistentes a todos antibióticos β -lactâmicos. Entretanto nem sempre é fácil detectar a resistência a meticilina pelos métodos convencionais de suscetibilidade. Este estudo prospectivo foi realizado para determinar a prevalência do gene *mecA* e a eficiência dos discos de cefoxitina e oxacilina para caracterizar a resistência a meticilina mediada pelo gene *mecA* em SCoN. Além disso, também foi caracterizada a distribuição do gene *mecA* entre as espécies de SCoN e o perfil de resistência aos antimicrobianos. Um total de 181 SCoN de hemoculturas foram analisadas. A prevalência do gene *mecA* entre estes isolados foi de 71,3%. A sensibilidade do teste de disco difusão (DD) de cefoxitina e oxacilina para todas espécies de SCoN foi de 100% e 98,4%, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 93% e 89,3%. Não foi possível detectar o gene *mecA* em quatro (2,2%) isolados resistentes a ambos os discos de cefoxitina e oxacilina. Estes isolados tiveram redução da resistência em presença do ácido clavulânico. As espécies prevalentes de SCoN foram o *S. epidermidis* com 64% dos isolados, seguido pelo *S. hominis* com 10%, *S. haemolyticus* com 8,8%, *S. capitis* com 7,7%. A percentagem de isolados positivos para o gene *mecA* foi maior para *S. haemolyticus* (98,3%), seguido pelo *S. epidermidis* (75%) e *S. hominis* (72,2%). Os MR-SCoN apresentaram um nível de resistência maior a todos os antibióticos não β -lactâmicos quando comparados com os SCoN sensíveis a meticilina e a diferença foi estatisticamente significativa, exceto para doxiciclina.

Keywords: Estafilococos coagulase negativa, resistência a meticilina, PCR.

INTRODUCTION

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) have emerged as important nosocomial pathogens during the last few decades. The CoNS represent an important etiology of nosocomial bloodstream infections especially in neonate, in immunocompromised individuals and in patients with implanted medical devices (29).

Methicillin resistant and multi-drug-resistant CoNS are commonly isolated in hospitalized patients, probably reflecting the adaptation of nosocomial clones to the selective pressure caused by widespread use of antibiotics in hospitals (17, 28). Methicillin resistance is due to the acquisition of a large DNA element termed staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), which integrates into the chromosome of *Staphylococcus aureus* and CoNS (12). Methicillin resistance is mediated by the *mecA* gene harbored in the SCC*mec* (13).

Nowadays MR-CoNS strains are highly prevalent and may reach, as many as 70% of the CoNS identified from blood culture in Europe, Latin America and the United States (7, 29) In Switzerland, however, the level of methicillin resistance among CoNS is lower 44% (28). In Brazil, methicillin resistance may be presented in over 80% of bloodstream infections (21). The SCOPE Surveillance Program ranks CoNS as the leading cause of nosocomial bloodstream infections and the SENTRY program report the SCoN as the second most common cause of nosocomial bloodstream infections (7, 15, 19).

Resistance to methicillin is often difficult to detect by conventional susceptibility testing methods. A characteristic of methicillin resistance is usually heterogeneous expression, which means that the growth in the presence of β

lactamics select highly resistant subclones from a population with low methicillin MICs. The causes of heteroresistance are a number of chromosomal factors whose activity affects the level of resistance; many of these genes are involved in cell wall biosynthesis (3).

However, the major causes of resistance to methicillin seem to be the expression of the *mecA* gene, and beta lactamase hyperproduction, though the resistance mediated by the beta lactamase hyperproduction is less frequent. These two factors have been shown to be important in clinical isolates (9). The resistance to methicillin is difficult to detect due to the complexity of the regulatory system of *mecA* and *blaZ* genes. The beta lactamase (*bla* gene) and PBP2a (*mecA* gene) are genetically and biochemically distinct, but both are regulated by a similar sensor transducer and repressor proteins. Therefore either *bla* or *mec* genes can control production of PBP2a and β -lactamase because of the high degree of homology of the two systems (32).

Detection of a *mecA* gene by PCR is considered the “gold standard” (1). Considering that in most clinical laboratories it is not possible to characterize methicillin resistance by genotypic methods, the use of phenotypic methodologies has to be optimized. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) proposed the use of cefoxitin disks (30 μ g) as a screening method for the prediction of resistance mediated by the *mecA* gene in all CoNS species (5).

The aim of this work was to evaluate the prevalence of methicillin resistance mediated by the *mecA* gene among CoNS, obtained from patients at a tertiary hospital in southern Brazil. Also was evaluate the efficiency of the cefoxitin disk and

oxacillin disk to characterize the methicillin resistance mediated by the *mecA* gene in CoNS. The distribution of resistance to methicillin (*mecA* gene) among staphylococci species was also characterized. Also was the aim of this work the comparison of the resistance to non β -lactamics antimicrobials among CoNS which harbored the *mecA* gene and the CoNS which not harbored the *mecA* gene.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates. A total of 181 clinical isolates of CoNS were obtained from blood cultures from patients hospitalized at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, between August 2004 and December 2005. The study included only one isolate per patient, or more than one isolated when they were obtained in a three days interval. The blood cultures were performed using Bact Alert[®] (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). The colony morphology, the Gram stain reaction, the catalase test and the absence of the coagulase enzyme were used to screen for CoNS identification.

Antimicrobial susceptibility test. The antimicrobial susceptibility test was performed by the disk diffusion method on Mueller Hinton Agar (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France), according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006), with the following antimicrobial: oxacillin (1 μ g), cefoxitin (30 μ g), vancomycin (30 μ g), gentamicin (10 μ g), clindamycin (2 μ g), chloramphenicol (30 μ g), doxycycline (30 μ g), erythromycin (15 μ g), levofloxacin (5 μ g), rifampin (5 μ g) and trimethoprim-sulfamethoxazole (25 μ g). *S. aureus* ATCC 25923 was used for quality control.

β -Lactam antimicrobial inactivation test. The resistance decrease test with clavulanic acid (DTCA) was performed according to a protocol previously described (17).

DNA extraction and quantification. The isolates were cultured on Mueller Hinton Agar and incubated at 35°C for 18 to 24 hours. A bacterial suspension equivalent to 1.0 McFarland was prepared in 500 μ l of 10mM TRIS – 1mM EDTA (pH 8.0). The suspension was homogenized in vortex and heated at 100°C for 10 minutes (30). Afterwards, the suspension was frozen at -20°C for two hours and then centrifuged at 9,000 g for 3 min. The DNA from 20 random isolates was quantified using GeneQuant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotec's, Pistacaway, USA).

Species identification. The molecular identification of *S. epidermidis* was performed by *Polymerase Chain Reaction* (PCR), with primers from a species-specific probe for the identification of *tuf* gene (16). The isolates that were not identified as *S. epidermidis* were submitted to the API ID 32 STAPH (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) semi-automated system.

Determination of *mecA* gene. The PCR procedure was used to verify the presence of the *mecA* gene. Primers F1 (5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG) and F2 (5'-ATGT CGCTTGTTATGTGC), which amplified a 310-bp fragment of the *mecA* gene, (26), that was visualized under ultraviolet light by the addition of ethidium bromide (0.5 μ g/ml) in agarose gel at 2.0%. *S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. aureus* ATCC 33591 were used as negative and positive controls.

Sequencing and computer analysis of sequences: The DNA fragments amplified by PCR (310pb) of the *mecA* gene were sequenced. A homology search was performed with de BLAST and Chromas programs and DDBJ/EMBL/GeneBank databases.

Statistical analysis: The descriptive statistical analysis was undertaken by the EPI INFO 6 program to determine de sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. The Qui-Square test was also performed by SPSS-11 to compare the non β -lactamics resistance among CoNS methicillin resistant and CoNS methicilin susceptible.

RESULTS

The 181 CoNS clinical isolates of blood cultures were submitted to the disk diffusion test (DD) with cefoxitin and oxacillin disk, and the results were compared to the presence of the *mecA* gene by PCR (Figure 1). Overall 129 isolates contained the *mecA* gene among the SCoN indicate a prevalence of 71.3% (IC of 95%: 64.0 to 77.7).

All *mecA* positive CoNS were resistant to cefoxitin DD test. There were no false negatives results. Therefore, the sensitivity for the DD test with cefoxitin was 100% (IC of 95%: 96.3 to 100). Considering that the 48 isolates were sensitive for the DD test and 52 were negative for PCR, four false-positive results were obtained. Thus the specificity was 93% (IC of 95%: 81.9 to 97.7). For the DD test with cefoxitin, the positive predictive value (PPV) was 96.9% (IC of 95%: 91.8 to 99.0) and the negative predictive value (NPV) was 100% (IC 91.4 to 100) (Table 1).

The DD test with oxacillin detected 127 resistant isolates out of 129 positive results by PCR, being that there were two false-negative results. Thus the sensitivity of the test with oxacillin was 98% (IC of 95%: 93.8 to 99.7). From the 52 negative results by PCR, the DD test with oxacillin indicated only 46 isolates susceptible. It was concluded that 6 isolates had false-positive results. Therefore the specificity for the test was 89% (IC of 95%: 77.4 to 95.6). Evaluating the results of the DD test with oxacillin, the PPV was 95.3% (IC of 95%: 89.7 to 98.1) and the NPV was 96.2% (IC of 85.7 to 99.3) (Table 1).

The four isolates that were resistant to the DD test for both oxacillin and cefoxitin but that presented negative PCR for the *mecA* gene were submitted to DTCA for the detection of hyperproduction of beta lactamase. The test was positive for all isolates. Among the 6 isolates resistant to DD with oxacillin, 4 had positive result for the decrease test with clavulanic acid. The other two isolates were sensitive for the DD test with cefoxitin and presented negative PCR for the *mecA* gene.

A total of 116 out of 181 isolates were identified by PCR for the species-specific *tuf* gene as *S. epidermidis* (64% of all CoNS). The other 65 isolates were identified phenotypically, resulting in 18 (10%) *S. hominis*, followed by 16 (8.8%) of *S. haemolyticus*, 14 (7.7%) *S. capitis*, 3 (1.6%) *S. warneri*, 2 (1.1%) *S. saprophyticus*, 1 (0.5%) *S. lugdunensis* and 1 (0.5%) *S. sciuri*. We have not obtained the phenotypically identification of 10 (5.5%) isolates, the fenotipic test result in very small or no information about this isolates.

The only one isolate of *S. sciuri* presented the *mecA* gene. The highest prevalence of *mecA* gene was for *S. haemolyticus* with 93.8%, *S. capitis* with 85.7%,

S. epidermidis with 75% and *S. hominis* with 72.2% resistance. Among the 10 CoNS not identified, only one presented the *mecA* gene. None of the *S. warneri*, *S. saprophyticus* and *S. lugdunensis* presented the *mecA* gene (Table 2).

The resistance to non-beta lactamics antibiotics to the CoNS isolates with the *mecA* gene was higher in relation to the isolates without the *mecA* gene, proved to be statistically significant for ciprofloxacin (66.4 vs. 15.6%, $p = 0,000$), cloranfenicol (38.7 vs. 13.3%, $p = 0,001$), eritromicin (73.6 vs. 34.1%, $p = 0,000$), levofloxacin (56.4 vs. 9.5%, $p = 0,000$), gentamicina (87.2 vs. 16.3%, $p = 0,000$), rifampin (28 vs. 2.2%, $p = 0,000$) and trimethoprim-sulphametoxazole (72 vs. 28.9%, $p = 0,000$), except for doxycyclin (21.1 vs. 15.6%, $p = 0,514$) (Table 3).

Among the 129 isolates who harbored the *mecA* gene, 66 isolates were multidrug resistant (resistant to five or more antimicrobials) The overall range of multiresistance among these SCoN is 51%.

DISCUSSION

The result of the *mecA* gene detection demonstrated that 129 isolates presented the *mecA* gene considered gold standard for the detection of resistance to methicillin, but 52 did not present the *mecA* gene (1). In this context, we have a prevalence of 71.3% of resistance to methicillin mediated by the *mecA* gene among nosocomial isolates of CoNS. A similar prevalence is referred by a multicentric study in Spain. Among the clinically significant CoNS isolates of this study, 70.6% were resistant to methicillin (20). In a study undertaken in Europe between 2002 and 2004 for the Daptomicine Vigilance Program, Sader and collaborators also evaluated the resistance to methicillin of 1.942 CoNS isolates. The resistance found for these

isolates was of 77% (22). Moreover results from the United States, Canada, Latin America, Europe and Japan, indicated that resistance to methicillin varies between 73 to 77%, being that the highest values are reported in Japan (7).

The general distribution of the species of CoNS identified in this study demonstrated that the main pathogen associated to the bacteremias was the *S. epidermidis* (14, 27). Although, *S.hominis* and *S.haemolyticus* were also present in blood cultures in considerable rate. The *S. haemolyticus* is considered an important pathogen due to its ability to develop multiresistance (25). The distribution of the *mecA* gene among the species of staphylococcus is quite distinct. The percentage of *mecA*-positive strains was highest for *S. haemolyticus* (93%), followed by *S. epidermidis* (75%) and *S. hominis* (72.2%). These results are concordant with the Hussan and collaborators (2001) (11). The *S. sciuri* are known as initial reservoir for the *mecA* gene, therefore it is expected that they present resistance; this was also found in this study (6, 23).

The sensitivity and specificity of the cefoxitin DD test for the evaluation of methicillin resistance, was higher than the sensitivity and specificity of the DD test with oxacillin for all the CoNS (100, 98% and 93, 89% respectively). Using cefoxitin 30 µg, all *mecA* positive CoNS isolates were adequately characterized, while oxacillin 1µg disk presented 1.5% (2/129) of false-negative results. Test with cefoxitin 30 µg also presented 7.7% (4/52) of false-positive results. The oxacillin 1µg disk presented 11.5% (6/52) of false-positive results (24). Detection of oxacillin resistance among CoNS isolates is difficult mainly due to heterogeneity of the control of repressor-promoter expression (4). Cefoxitin is therefore considered to be a better predictor than oxacillin for the detection of oxacillin heteroresistance because it is a

stronger inducer of PBP2a (8). The cefoxitin DD test can be used to predict the presence of *mecA* gene in CoNS with a high degree of sensitivity and specificity when compared to *mecA* detection using PCR (24). Above all, the halos are easier to visualize with the cefoxitin discs than with the oxacillin discs (5).

Four (2.2%) of the false positive isolates (for oxacillin and cefoxitin) had positive DTCA (30) being therefore possible to suppose that these isolates presented hyperproduction of β -lactamase. In the present study, beta-lactamase hyperproduction appeared to be the major cause of false-positive detection of oxacillin resistance in CoNS by phenotypic methods (9). Two isolates, identified as *S. epidermidis*, had complete reduction of resistance. Thus, with the use of clavulanic acid the isolate could be considered sensitive according with the standard, when compared with the test without clavulanic acid. With these results was supposed that for these isolates, the main mechanism of resistance involved is the hyperproduction of beta lactamase (9).

The other two isolates had a reduction of resistance with the clavulanic acid without however becoming susceptible. It can be concluded that there must be more than one type of mechanism involved in the resistance expression of these isolates. Hiramatsu and colleagues reported that *mecA* independent methicillin resistance occurs in more or less 3% in methicillin resistant strains of CoNS) (31).

Methicillin resistant CoNS showed a higher level of resistance to all antimicrobials when compared to methicillin sensitive CoNS, except doxycycline. It is known that the *mecA* gene is inserted in a mobile genetic element (SCC*mec*) that contains other resistance genes, became the isolates that harbored this gene

resistant to several antibiotics (12). Because of this, a high level of multidrug resistance was expected among CoNS that harbored the *mecA* gene. The percentage was 51%, although the resistance rate to multiple antibiotics finding in other study was higher (10).

It can be concluded that the β -lactamase hyperproduction appears to be the major reason for the discordance between phenotypic and genotypic methods for the detection of methicillin resistant CoNS mediated by the *mecA* gene. In addition, the results of DD with cefoxitin 30 μ g disk showed that this is the best single test for the evaluation of oxacillin resistance mediated by the *mecA* gene for all CoNS species isolated in the blood stream of patients in our institution.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos at Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the support to this work.

REFERENCES

1. Brown, D. F. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother.*, 48 Suppl 1:65-70, 2001.
2. Chambers, H. F. Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother.*, 31(12):1919-24, 1987.
3. Chambers, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. (1988). *Clin Microbiol Rev.*, 1(2):173-86, 1988.

4. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.*, 10(4):781-91, 1997.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 14th ed., vol. 24 no 1. Approved standard M2-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2004.
6. Couto, I.; Wu, S.W.; Tomasz, A.; de Lencastre, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to s. *J Bacteriol.*, 185(2):645-53, 2003.
7. Diekema, D.J.; Pfaller, M.A.; Schmitz, F.J.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R.N.; Beach, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.*, 32:S114-S132, 2001.
8. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*; 40(8):2766-71, 2002.
9. Ghoshal, U.; Prasad, K.N.; Singh, M.; Tiwari, D.P.; Ayyagari, A. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Infect Chemother.* 10(2):86-89, 2004.

10. Huang SY, Tang RB, Chen SJ, Chung RL. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility. *J Microbiol Immunol Infect*; 36(1): 51-5, 2003.
11. Hussain, Z., Stoakes L., Massey V., Diagre D., Fitzgerald V., Sayed S. EL.; Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 38:752-754,2000.
12. 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* 43, 1449-1458, 1999.
13. Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1323-36, 2001.
14. Kleeman, K.T.; Bannerman, T.L.; Kloos, W.E. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol.*, 31(5):1318-21, 1993.
15. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 30(3):205-14, 1998.

16. Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 34, 2888-2893, 1996.
17. McDougal, L.K.; Thornsberry, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol.* 23(5):832-9, 1986.
18. O'Gara, J. P.; Humphreys, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 150(7): 582-7, 2001.
19. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis;* 33(4): 283-97, 1999.
20. Picazo, J.J.; Betriu, C.; Rodriguez-Avial, I.; Culebras, E.; Gómez, M., Lopez, F. Grupo VIRA. Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 24(10):617-28 [Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006].
21. Sader, H. S.; Jones, R. N.; Gales, A. C.; Silva, J. B.; Pignatari, A. C. (2004). SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through. *Braz J Infect Dis.* Feb; 8(1):25-79, 2001.
22. Sader, H.S.; Streit, J.M.; Fritsche, T.R.; Jones, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the

- Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). *Clin Microbiol Infect.*, 12(9):844-52, 2006.
23. Stepanovic, S.; Hauschild, T.; Dakic, I.; Al-Doori, Z.; Svabic-Vlahovic, M.; Ranin, L.; Morrison, D. Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J Clin Microbiol.*, 44(3):934-7, 2006.
24. Swenson, J.M.; Tenover, F.C.; Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.*, 43(8):3818-23, 2005.
25. Tabe, Y.; Nakamura, A.; Oguri, T.; Igari, J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 32(3):177-83, 1998.
26. Vannuffel, P.; Gigi, J.; Ezzedine, H.; Vandercam, B.; Delmee, M.; Wauters, G.; Gala, J. L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*, 33:2864-2867, 1995.
27. Weinstein, M.P.; Mirrett, S.; Van Pelt, L.; McKinnon, M.; Zimmer, B.L.; Kloos, W.; Reller, L.B. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive panels versus a conventional reference method. *J Clin Microbiol.*, 36(7):2089-92, 1998.
28. Widerstrom, M.; Monsen, T.; Karlsson, C., Wistrom, J. Molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *J Hosp Infect.*, 64(2):177-83, 2006.

29. Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S. M.; Seifert, H.; Wenzel, R. P.; Edmond M .B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.*, 39:309-317, 2006.
30. York, M.K., Gibbs, L., Chehan, F., and Brooks, G. F. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbol.* 34:249-253, 1996.
31. Yoshida, R.; Kuwahara-Arai, K.; Baba, T.; Cui, L.; Richardson, J.F.; Hiramatsu, K. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother.*, 51(2):247-55, 2003.
32. Zhang, H.Z.; Hackbarth, C.J.; Chansky, K.M.; Chambers, H.F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactamics in staphylococci. *Science.* 9; 291(5510):1915-6, 2001.

Table 1. Results of DD test with oxacillin, cefoxitin and results of PCR of 181 CoNS isolates

	PCR <i>mecA</i> gene				PCR <i>mecA</i> gene		
Oxacilin	Positive	Negative	Total	Cefoxitin	Positive	Negative	Total
Resistente	123	6	129	Resistente	125	4	129
Sensível	2	50	52	Sensível	0	52	52
Total	125	56	181	Total	125	56	181

Table 2. Distribution of CoNS species and *mecA* gene among the species.

	N ^o (%) Resistance among the CoNS species								Total	
	<i>S.epiderm</i> ^a	<i>S.hominis</i>	<i>S.haemo</i> ^b	<i>S.capitis</i>	<i>S.sciuri</i>	<i>S.warneri</i>	<i>S.saprop</i> ^c	<i>S.lugdun</i> ^d		NI ^e
Total	116	18	16	14	1	3	2	1	10	181
<i>mecA</i> pos	87 (75)	13(72,2)	15 (93,8)	12(85,7)	1(100)	0	0	0	1 (10)	129 (71,3)
<i>mecA</i> neg	29 (25)	5 (27,8)	1 (6,2)	2 (14,3)	0 (0)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	9 (90)	52 (28,7)

^a *S. epidermidis*; ^b *S. haemolyticus*; ^c *S. saprophyticus*; ^d *S. lugdunensis*; ^e NI não identificado

Table 3. Comparison of resistance to non β -lactamics antimicrobials among the CoNS which harbored the *mecA* gene and the CoNS which not harbored the *mecA* gene.

	N ^o (%) isolates with and without <i>mecA</i> gene x resistance to non β -lactamics antimicrobials ^a								
	CLIN	CLOR	DOXI ^b	ERITRO	GENTA	LEVO	RIFAM	SULFA	VANCO
<i>mecA</i> positive	81 (66,4)	48 (38,7)	26 (21,1)	92 (73,6)	109 (87,2)	66 (56,4)	35 (28)	90 (72)	0
<i>mecA</i> negative	7 (15,6)	6 (13,3)	7 (15,6)	15 (34,1)	7 (16,3)	4 (9,5)	1 (2,2)	13 (28,9)	0

^a CLIN: clindamicin; CLOR: cloranfenicol; DOXI: doxycyclin; ERITRO: erythromycin; GENTA: gentamicin; LEVO: levofloxacin; RIFA: rifampicin; SULFA: sulphamethoxazol; VANCO: vancomicin

^b The difference of resistance to doxycycline to non β -lactamics antimicrobials among the CoNS which harbored the *mecA* gene and the CoNS which not harbored the *mecA* gene was not statistically significative.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

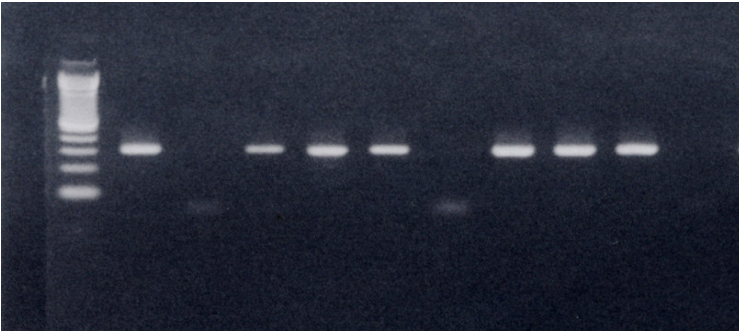


Figure 1: PCR for *mecA* gene. Lane 1: molecular weight standard (100pb); lines 2: positive control *S. aureus* ATCC 33591; lane 3: negative control *S. epidermidis* ATCC 12228; Lanes 4, 5 and 6: isolate number 173 (*S. epidermidis*) harboring *mecA* gene; lane 7: negative control; lanes: 8, 9 and 10: isolate number 110 (*S. capitis*) harboring *mecA* gene

Há discrepâncias entre a detecção do gene *mecA* nos *Staphylococcus* spp coagulase negativa por PCR e por teste de disco difusão com cefoxitin e oxacillin? Qual o papel da hiperprodução de β -lactamase?

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado* , Keli Cristine Reiter, Rodrigo Minuto Paiva, Afonso Luis Barth

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Running Title: **Resistência a metilina nos SCoN**

* Corresponding author. Mailing address:

Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular
Rua Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre – RS
Brasil -90.035.-903

Phone/FAX: +55 5121018860

E-mail: abmachado@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are a common cause of nosocomial infections and they have the tendency to develop resistance to methicillin (MR-SCoN) and multiple antibiotics. Moreover the resistance to methicillin may not be easily detected by conventional susceptibility methods. The MR-CoNS are considered resistant to all β -lactamics antibiotics. This prospective study was aimed to determine the prevalence of *mecA* gene and the efficiency of the cefoxitin and oxacillin disk diffusion test to characterize the methicillin resistance mediated by the gene *mecA* in CoNS. The *mecA* gene distribution among the species of CoNS isolates and the antimicrobial resistance profile were also characterized. A total of 181 CoNS from bloodstream culture were analyzed and the global prevalence of *mecA* gene was 71.3%. The sensitivity of oxacillin and cefoxitin disks for all CoNS species was 100% and 98.4% respectively, whereas the specificity was 93% and 89.3 %. It was not possible to detect *mecA* gene in four (2.2%) isolates which were resistant to both cefoxitin and oxacillin. These isolates regained sensitive methicillin in the presence of clavulanic acid. Among the CoNS the commonest species was the *S. epidermidis* which 64% of the isolates followed by *S. hominis* 10%, *S. haemolyticus* 8.8% and *S. capitis* 7.7%. The percentage of *mecA*-positive isolates was highest for *S. haemolyticus* (93.8%), followed by *S. epidermidis* (75%) and *S. hominis* (72.2%). The MR-CoNS showed higher level of resistance to all non beta-lactamics antimicrobials as compared to methicillin sensitive CoNS and the difference were statistically significant except in regard to doxycycline.

Keywords: Coagulase negative staphylococci, methicillin resistant, PCR, antimicrobial profile

Há discrepâncias entre a detecção do gene *mecA* nos *Staphylococcus* spp coagulase negativa por PCR e por teste de disco difusão com cefoxitin e oxacillin? Qual o papel da hiperprodução de β -lactamase?

RESUMO

Os estafilococos coagulase-negativa (SCoN) são causa comum de bacteremias, especialmente em recém-nascidos, e pacientes com implantes de biomateriais. Os SCoN apresentam a tendência de desenvolver resistência a meticilina e múltiplos antibióticos. Os SCoN resistentes a meticilina são considerados resistentes a todos antibióticos β lactâmicos. Entretanto nem sempre é fácil detectar a resistência a meticilina pelos métodos convencionais de suscetibilidade. Este estudo prospectivo foi realizado para determinar a prevalência do gene *mecA* e a eficiência dos discos de cefoxitina e oxacilina para caracterizar a resistência a meticilina mediada pelo gene *mecA* em SCoN. Além disso, também foi caracterizada a distribuição do gene *mecA* entre as espécies de SCoN e o perfil de resistência aos antimicrobianos. Um total de 181 SCoN de hemoculturas foram analisadas. A prevalência do gene *mecA* entre estes isolados foi de 71,3%. A sensibilidade dos discos de cefoxitina e oxacilina para todas espécies de SCoN foi de 100% e 98,4%, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 93% e 89,3%. Não foi possível detectar o gene *mecA* em quatro (2,2%) isolados resistentes a ambos discos de cefoxitina e oxacilina. Estes isolados tiveram redução da resistência em presença do ácido clavulânico. Entre as espécies de SCoN o *S. epidermidis* foi o mais prevalente com 64% dos isolados, seguido pelo *S. hominis* com 10%, *S. haemolyticus* com 8,8%, *S. capitis* com 7,7%, *S. warneri* com 1,6%, *S. saprophyticus* com 1,1%, *S. lugdunensis* com 0,5% e pelo *S. sciuri* com 0,5%. Dez isolados (5,5%) não foram identificados. A percentagem de isolados positivos para o gene *mecA* foi maior para *S. haemolyticus* (98,3%), seguido pelo *S. epidermidis* (75%) e *S. hominis* (72,2%). Os SCoN resistentes a meticilina apresentaram um nível de resistência maior a todos os antibióticos não beta lactâmicos quando comparados com os SCoN sensíveis a meticilina, exceto para doxiciclina.

Palavras chave: *Staphylococcus spp* coagulase negativa, resistência a metilina, PCR, perfil antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus spp* coagulase negativa (SCoN), durante as últimas décadas, tem emergido como um importante patógeno nosocomial. Os SCoN são agentes etiológicos importantes de hemoculturas nosocomiais, especialmente em neonatos, em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com implantes de biomateriais ou cateteres (29).

SCoN resistentes à metilina e multiresistentes são comumente isolados em pacientes hospitalares, provavelmente refletindo a adaptação de clones nosocomiais causados pela pressão seletiva conseqüente do uso indiscriminado de antibióticos no meio hospitalar (18, 28). A resistência a metilina é devido a aquisição de um elemento de DNA denominado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), integrado em um sítio específico no cromossomo dos *S. aureus* e SCoN (12). A resistência a metilina é mediada pelo gene *mecA* integrado no SCC*mec* (13).

Atualmente as cepas de MR-CoNS são altamente prevalentes e podem alcançar em torno de 70% dos CoNS obtidos em hemoculturas na Europa, América Latina e Estados Unidos (7, 29), Na Suíça, entretanto o nível de resistência a metilina entre os SCoN é mais baixo, 44% (28). No Brasil a resistência a metilina é em torno de 80% para isolados de hemoculturas (21). O “SCOPE Surveillance Program” classifica os SCoN como principal causa de hemoculturas nosocomiais e

o SENTRY reporta como segundo agente etiológico de hemoculturas nosocomiais (7, 15, 19).

A resistência à metilina é freqüentemente difícil de detectar por métodos convencionais de suscetibilidade. A expressão da resistência à metilina é usualmente heterogênea o que significa que o crescimento em presença dos antibióticos β -lactâmicos seleciona subclones altamente resistentes em uma população com MICs baixos para metilina. As causas da heteroresistência são vários fatores cromossômicos cuja atividade afeta o nível da resistência, muitos destes genes estão envolvidos na biossíntese da parede celular (3).

Entretanto, as principais causas da resistência a metilina parecem ser a expressão do gene *mecA* e a hiperprodução de β -lactamase, embora esta última, seja menos freqüente. Os dois fatores têm demonstrado importância em isolados clínicos (9). Porém devido a complexidade dos sistemas regulatórios do *mecA* e *blaZ* a resistência é difícil de detectar. Tanto o gene da β -lactamase (*bla*) como o da PBP2a (*mecA*) são geneticamente e bioquimicamente distintos, porém ambos são regulados por um sistema indutor e repressor similar. Assim tanto o gene *bla* ou o *mec* podem controlar a produção da PBP2a e da β -lactamase devido à homologia dos dois sistemas regulatórios (31).

A detecção do gene *mecA* é considerada padrão ouro (1). Considerando que a maioria dos laboratórios clínicos não pode caracterizar a resistência por métodos genotípicos, deve-se otimizar o uso das metodologias fenotípicas. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) propôs o uso de discos de cefoxitina (30 μ g)

como método de *screening* para predizer a resistência mediada pelo gene *mecA* para todas espécies de SCoN (5).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência da resistência à metilicina mediada pelo gene *mecA* nos SCoN. Também foi determinar a eficiência (sensibilidade, especificidade) do teste de disco difusão com cefoxitina e oxacilina para caracterizar a resistência mediada pelo gene *mecA* nos SCoN obtidos de pacientes de um hospital terciário do sul do Brasil. Além disso, foi caracterizada a distribuição do gene *mecA* entre as espécies de SCoN. Finalmente, foi feita a comparação da resistência aos antibióticos não β -lactâmicos entre os SCoN resistentes e sensíveis a metilicina.

MATERIAIS E METODOS

Isolados bacterianos. Um total de 181 isolados clínicos de SCoN obtidos de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre agosto de 2004 e dezembro de 2005. Foi incluído no estudo um isolado clínico por paciente, ou mais de um isolado quando obtido em um intervalo de três dias. As hemoculturas foram realizadas em sistema automatizado Bact Alert[®] (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França) A morfologia da colônia, a coloração pelo método de Gram, o teste da catalase e a ausência da enzima coagulase foram utilizados como métodos de identificação para triagem de SCoN.

Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi executado em Agar Mueller Hinton (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França), segundo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2006), com os seguintes antimicrobianos: oxacilina (1 μ g), cefoxitina (30 μ g),

vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), doxacilina (30 µg), eritromicina (15 µg), levofloxacina (5 µg), rifampicina (5 µg), sulfametoxazol (25 µg). A cepa padrão utilizada para o controle de qualidade foi *S. aureus* ATCC 25923.

Teste de inativação do antibiótico β-Lactâmico. O teste da redução da resistência em presença do ácido clavulânico foi executado de acordo com o protocolo previamente descrito por Mc Dougal L & Thornsberry, 1986 (17).

Extração e quantificação de DNA. Os isolados foram cultivados em Agar Mueller Hinton incubados a 35 °C por 18 a 24 horas. Uma suspensão bacteriana equivalente a 1,0 na escala de McFarland foi preparada em 500 µl de 10 mM TRIS – 1mM EDTA (pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e aquecida a 100 °C por 10 minutos (30). Após, a suspensão foi congelada a -20 °C por duas horas e então centrifugada a 9.000 g por 3 min. O DNA de 20 isolados aleatórios foi quantificado utilizando o Gene Quant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotec's, Pistacaway, USA).

Identificação das espécies. A identificação molecular da espécie *S. epidermidis* foi feita pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), com *primers* para a identificação do gene *tuf* espécie específico (16). Os isolados que não foram classificados como *S. epidermidis* foram submetidos à identificação fenotípica pelo sistema semi-automatizado API ID 32 STAPH (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França).

Determinação do gene *mecA*. A técnica de PCR foi executada para verificar a presença do gene *mecA*. Os primers F1 (5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG) e F2 (5'-ATGT CGCTTGTTATGTGC), que amplificam um fragmento de 310 pb do gene

mecA (26) que foi visualizado com luz ultravioleta e adição de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) em gel de agarose 2%. *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 33591 foram utilizados como controles negativo e positivo.

Sequenciamento e análise das seqüências: a seqüência de nucleotídeos do gene *mecA* foi determinada usando os fragmentos amplificados de DNA por PCR. A comparação da homologia foi feita com os programas BLAST, Chromas e DDBJ/EMBL/GeneBank.

Análise estatística: Foi realizada uma análise estatística descritiva feita pelo programa EPI INFO 6 para calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Também foi utilizado o SPSS-11 para realizar o teste de Qui-quadrado e comparar a resistência aos antibióticos não beta lactâmicos dos SCoN resistentes à metilina e dos SCoN suscetíveis à metilina.

RESULTADOS

Os 181 isolados clínicos de SCoN de hemoculturas foram submetidos ao teste de disco difusão (DD) com cefoxitina e oxacilina, os resultados foram comparados com a presença do gene *mecA* por PCR (Figura 1). Foram detectados 129 isolados que continham o gene *mecA* indicando uma prevalência de 71,3 % entre os SCoN (IC de 95%: 64,0 a 77,7).

Todos o SCoN *mecA* positivos foram resistentes a cefoxitina, indicando a sensibilidade para o teste de DD com cefoxitina foi de 100% (IC de 95%: 96,3 a 100). Considerando que 48 isolados foram sensíveis para o teste de DD e 52 foram negativos por PCR tivemos quatro resultados falso-positivos. Deste modo, a

especificidade foi de 93% (IC de 95%: 81,9 a 97,7). Para o teste de DD com cefoxitina o valor preditivo positivo (VPP) foi de 96,9% (IC de 95% 91,8 a 99,0) e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 100% (para um nível de confiança de 95% IC 91,4 a 100) (Tabela 1).

O teste de DD com oxacilina detectou 127 isolados resistentes dos 129 resultados positivos por PCR, houve dois resultados falso-negativos. Deste modo a sensibilidade do teste de DD com oxacilina foi de 98% (IC de 95%: 93,8 A 99,7). Para os 52 resultados negativos por PCR, o teste de DD com oxacilina indicou somente 46 isolados suscetíveis. Sendo assim a especificidade para o teste foi de 89% (IC de 95%: 77,4 a 95,6). Avaliando os resultados para o teste de DD com oxacilina o VPP de 95,3% (IC de 95% 89,7 a 98,1) e o VPN de 96,2% (IC 85,7 a 99,3) (Tabela 1).

Os quatro isolados resistentes para o teste de DD para ambos, cefoxitina e oxacilina, mas com PCR para o gene *mecA* negativo, foram submetidos ao teste DTCA detecção de hiperprodução de beta lactamase. O teste foi positivo para quatro isolados.

Entre os 6 isolados resistentes pelo DD com oxacilina, 4 tiveram resultado positivo para o teste da redução da resistência pelo ácido clavulânico. Os outros dois isolados foram suscetíveis para o teste de DD com cefoxitina e apresentaram PCR negativo para o gene *mecA*.

Os *S. epidermidis*, que entre os SCoN são a espécie mais prevalente, foram identificados por PCR para o gene *tuf* espécie específico. Por este método dos 181 isolados, 116 foram identificados como *S. epidermidis* (64% de todos isolados de SCoN). Os outros 65 isolados foram identificados fenotipicamente resultando em 18

(10%) de *S. hominis*, *S. haemolyticus* 16 (8,8%), *S. capitis* 14 (7,7%), *S. warneri* 3 (1,6%), *S. saprophyticus* 2 (1,1%), *S. lugdunensis* 1 (0,5%) e de *S. sciuri* 1 (0,5%). Para 10 (5,5%) isolados não obtivemos identificação ou obtivemos uma percentagem de identificação fenotípica muito baixa.

O único isolado de *S. sciuri* apresentou o gene *mecA*. A maior prevalência para o gene *mecA* foi entre os *S. haemolyticus* com 93,8%, *S. capitis* com 85,7%, *S. epidermidis* com 75% e *S. hominis* com 72,2% de resistência. Entre os 10 isolados de SCoN que não foram identificados apenas um apresentou o gene. Nenhum dos isolados de *S. warneri*, *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis* apresentou o gene *mecA* (Tabela 2).

Os isolados de SCoN com o gene *mecA* são mais resistentes aos antimicrobianos não β -lactâmicos que os SCoN sem o gene *mecA*. Esta resistência provou ser estatisticamente significativa para ciprofloxacina (66,4 vs. 15,6%, $p = 0,000$), cloranfenicol (38,7 vs. 13,3%, $p = 0,001$), eritromicina (73,6 vs. 34,1%, $p = 0,000$), levofloxacina (56,4 vs. 9,5%, $p = 0,000$), gentamicina (87,2 vs. 16,3%, $p = 0,000$), rifampina (28 vs 2,2%, $p = 0,000$) e sulfametoxazol-trimetoprim (72 vs. 28,9%, $p = 0,000$), exceto para doxaciclina (21,1 vs. 15,6%, $p = 0,514$) (Tabela 3). Entre os 129 isolados com o gene *mecA*, 66 isolados apresentaram multiresistência (resistência a cinco ou mais antimicrobianos). Assim a taxa de multiresistência entre estes SCoN foi de 51%.

DISCUSSÃO

A resistência dos SCoN não aumenta somente a morbidade e mortalidade, mas também os custos hospitalares dos pacientes. Os SCoN são considerados a maior causa de bacteremias em pacientes hospitalizados (15). Cerca de 30%

O resultado da detecção do gene *mecA* demonstrou que 129 isolados apresentaram o gene *mecA*, considerado padrão ouro para detecção da resistência a meticilina, mas 52 não apresentaram o gene *mecA* (1). Neste contexto, temos uma prevalência de 71,3% de resistência a meticilina mediada pelo gene *mecA* entre os isolados nosocomiais de SCoN. Uma pequena variabilidade em torno desta prevalência é referida em um estudo multicentrico na Espanha. Entre os isolados de SCoN clinicamente significativos deste estudo 70,6% foram resistentes a meticilina (19). Sader e colaboradores, em um estudo realizado na Europa, entre 2002 e 2004, para o Programa de Vigilância a Daptomicina, avaliaram também a resistência a meticilina para 1.942 isolados de SCoN. A resistência encontrada para estes isolados foi de 77% (22). Sobretudo resultados nos Estados Unidos, Canadá, América Latina, Europa e Japão indicam que a resistência a meticilina varia entre 73 a 77%, sendo os valores mais altos relativos ao Japão (7).

A distribuição geral das espécies de SCoN identificada neste estudo demonstrou que o principal patógeno associado as bacteremias é o *S. epidermidis* (14, 27). Entretanto os *S. hominis* e os *S. haemolyticus* também apresentam taxas importantes em hemoculturas. Os *S. haemolyticus* são considerados patógenos importantes devido a característica de desenvolver multiresistência (25). A percentagem de isolados *mecA* positivos foi maior para os *S. haemolyticus* (93%), seguido pelos *S. epidermidis* (75%) e *S. hominis* (72.2%) Estes resultados são concordantes com os de Hussain Z (2001) (11). Os *S. sciuri* são conhecidos como

reservatório inicial do gene *mecA*, portanto é esperado que apresentem resistência, este dado também foi encontrado neste estudo (6, 23).

A sensibilidade e especificidade do teste de DD com cefoxitina para avaliação da resistência a oxacilina foi maior que a sensibilidade e especificidade do teste de DD com oxacilina, para todos SCoN (100, 98, %, e 93, 89% respectivamente). Utilizando disco de cefoxitina 30 µg, todos SCoN *mecA* positivos foram adequadamente caracterizados, enquanto que com disco de oxacilina 1 µg encontramos 1.5% (2/129) de resultados falso negativo. Teste com cefoxitina 30 µg também apresentou 7.7% (4/52) de resultados falso-positivo. O disco de oxacillin 1 µg apresentou 11.5% (6/52) de resultados falso-positivo (24). Detecção da resistência a meticilina entre os SCoN é difícil, principalmente devido a heterogeneidade da expressão dos genes indutores e repressores (4). A cefoxitina é considerada um melhor preditor do que a oxacilina para detecção da heteroresistencia porque é um indutor mais forte da PBP2a (8). O teste de DD com cefoxitina pode ser usado para predizer a presença do gene *mecA* com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparada com a detecção do gene *mecA* por PCR (24). Sobretudo os halos com disco de cefoxitina são mais fáceis de visualizar que os de oxacilina (5).

Quatro dos isolados (2,2%) falso positivo (para oxacilina e cefoxitina) tiveram o DTCA positivo (30) supondo-se assim que estes isolados apresentam hiperprodução de beta lactamase. Neste estudo, hiperprodução de β-lactamase parece ser a maior causa da detecção de resultados falso-positivos para resistência com oxacilina em in SCoN por métodos fenotípicos (9). Dois isolados, identificados

como *S. epidermidis*, tiveram redução total da resistência. Isto é, na presença do ácido clavulânico o isolado pode ser considerado sensível de acordo com a padronização, quando comparado com o teste sem ácido clavulânico. Podemos supor que para estes isolados, o único mecanismo de resistência envolvido seja a hiperprodução de β -lactamase (9).

Os outros dois isolados tiveram redução da resistência até a concentração máxima de ácido clavulânico utilizada sem, no entanto, tornarem-se sensíveis. Conclui-se que deve haver mais de um tipo de mecanismo envolvido na expressão da resistência destes isolados. Hiramatsu e colaboradores relataram que a resistência a metilina independente do gene *mecA* ocorre em cerca de 3% dos isolados de MR-SCoN (31).

Os MR-SCoN tiveram maior nível de resistência a todos antibióticos não β -lactâmicos comparados aos SCoN sensíveis, exceto para doxamiclina. Sabe-se que o gene *mecA* está inserido em um elemento genético móvel (*SCCmec*) que contém outros genes de resistência, tornando os isolados que tem este gene resistentes a vários antibióticos (12). Por isso espera-se um alto nível de multiresistência entre os isolados de SCoN que contém o gene *mecA*. A percentagem de multiresistência foi de 51%, como era esperado, entretanto a taxa de resistência a múltiplos antibióticos encontrada em outro estudo foi maior (10).

Pode-se concluir que a hiperprodução de β -lactamase parece ser a principal razão da discordância entre os métodos fenotípicos e genotípicos de detecção da resistência à metilina nos SCoN. Mais ainda, os resultados do teste de DD com

cefexitina 30µg demonstraram que este é o melhor teste para avaliação da resistência à meticilina para todas as espécies de SCoN.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos at Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo financiamento desta pesquisa.

REFERENCIAS

1. Brown, D. F. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, 48 Suppl 1:65-70, 2001.
2. Chambers, H. F. Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother*, 31(12):1919-24, 1987.
3. Chambers, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev. Apr*; 1(2):173-86, 1988.
4. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev. Oct*; 10(4):781-91, 1997.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 16th ed., vol. 26 no 1. Approved standard M2-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2006.
6. Couto, I.; Wu, S.W.; Tomasz, A.; de Lencastre, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional

- activation of the *mecA* homologue native to s. *J Bacteriol.*, 185(2):645-53, 2003.
7. Diekema, D.J.; Pfaller, M.A.; Schmitz, F.J.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R.N.; Beach, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.*, 32:S114-S132, 2001.
 8. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*; 40(8):2766-71, 2002.
 9. Ghoshal, U.; Prasad, K.N.; Singh, M.; Tiwari, D.P.; Ayyagari, A. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Infect Chemother.* 10(2):86-89, 2004.
 10. Huang SY, Tang RB, Chen SJ, Chung RL. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility. *J Microbiol Immunol Infect*; 36(1): 51-5, 2003.
 11. Hussain, Z., Stoakes L., Massey V., Diagre D., Fitzgerald V., Sayed S. EL.; Lannigan R. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 38:752-754, 2000.

12. 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* 43, 1449-1458, 1999.
13. Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1323-36, 2001.
14. Kleeman, K.T.; Bannerman, T.L.; Kloos, W.E. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol.*, 31(5):1318-21, 1993.
15. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 30(3):205-14, 1998.
16. Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 34, 2888-2893, 1996.
17. McDougal, L.K.; Thornsberry, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol.* 23(5):832-9, 1986.

18. O'Gara, J. P.; Humphreys, H. Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 50(7): 582-7, 2001.
19. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 33(4): 283-97, 1999.
20. Picazo, J.J.; Betriu, C.; Rodriguez-Avial, I.; Culebras, E.; Gómez, M., Lopez, F. Grupo VIRA. Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 24(10):617-28 [Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006].
21. Sader, H. S.; Jones, R. N.; Gales, A. C.; Silva, J. B.; Pignatari, A. C. SENTRY Participants Group(Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* Feb;8(1):25-79, 2004.
22. Sader, H.S.; Streit, J.M.; Fritsche, T.R.; Jones, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). *Clin Microbiol Infect.*, 12(9):844-52, 2006.
23. Stepanovic, S.; Hauschild, T.; Dakic, I.; Al-Doori, Z.; Svabic-Vlahovic, M.; Ranin, L.; Morrison, D. Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J Clin Microbiol.*, 44(3):934-7, 2006.

24. Swenson, J.M.; Tenover, F.C.; Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.*, 43(8):3818-23, 2005.
25. Tabe, Y.; Nakamura, A.; Oguri, T.; Igari, J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 32(3):177-83, 1998.
26. Vannuffel, P.; Gigi, J.; Ezzedine, H.; Vandercam, B.; Delmee, M.; Wauters, G.; Gala, J. L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*, 33:2864-2867, 1995.
27. Weinstein, M.P.; Mirrett, S.; Van Pelt, L.; McKinnon, M.; Zimmer, B.L.; Kloos, W.; Reller, L.B. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan Rapid and Dried Overnight Gram-Positive panels versus a conventional reference method. *J Clin Microbiol.*, 36(7):2089-92, 1998.
28. Widerstrom, M.; Monsen, T.; Karlsson, C., Wistrom, J. Molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *J Hosp Infect.*, 64(2):177-83, 2006.
29. Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S. M.; Seifert, H.; Wenzel, R. P.; Edmond M .B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.*, 39:309-317, 2006.
30. York, M.K., Gibbs, L., Chehan, F., and Brooks, G. F. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine

methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbol.* **34**:249-253, 1996.

31. Yoshida, R.; Kuwahara-Arai, K.; Baba, T.; Cui, L.; Richardson, J.F.; Hiramatsu, K. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother.*, 51(2):247-55, 2003.
32. Zhang, H.Z.; Hackbarth, C.J.; Chansky, K.M.; Chambers, H.F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science*. 9; 291(5510):1915-6, 2001.

Tabela 1. Resultados dos testes de DD com oxacilina e cefoxitina e resultados do PCR para os 181 isolados de SCoN.

PCR gene <i>mecA</i>				PCR gene <i>mecA</i>			
Oxacilina	Positivo	Negative	Total	Cefoxitina	Positivo	Negativo-	Total
Resistente	123	6	129	Resistente	125	4	129
Sensível	2	50	52	Sensível	0	52	52
Total	125	56	181	Total	125	56	181

Tabela 2. Distribuição das espécies de SCON e distribuição do gene *mecA* entre as espécies.

	Nº (%) Resistência entre as espécies de SCoN								Total	
	<i>S.epiderm</i> ^a	<i>S.hominis</i>	<i>S.haemo</i> ^b	<i>S.capitis</i>	<i>S.sciuri</i>	<i>S.warneri</i>	<i>S.saprop</i> ^c	<i>S.lugdun</i> ^d		NI ^e
Total	116	18	16	14	1	3	2	1	10	181
<i>mecA</i> pos	87 (75)	13(72,2)	15 (93,8)	12(85,7)	1(100)	0	0	0	1 (10)	129 (71,3)
<i>mecA</i> neg	29 (25)	5 (27,8)	1 (6,2)	2 (14,3)	0	3 (100)	2 (100)	1 (100)	9 (90)	52 (28,7)

^a *S. epidermidis*; ^b *S. haemolyticus*; ^c *S. saprophyticus*; ^d *S. lugdunensis*; ^e NI não identificado.

Tabela 3. Comparação da resistência aos antibióticos não β lactâmicos entre os SCoN que tem o gene *mecA* e os SCoN que não tem o gene *mecA*.

	Nº (%) isolados com e sem o gene <i>mecA</i> x resistência aos antibióticos não β -lactâmicos ^a								
	clin	clor	doxi	eritro	genta	levo	rifam	sulfa	vanco
<i>mecA</i> positivo	81 (66,4)	48 (38,7)	26 (21,1)	92 (73,6)	109 (87,2)	66 (56,4)	35 (28)	90 (72)	0
<i>mecA</i> negativo	7 (15,6)	6 (13,3)	7 (15,6)	15 (34,1)	7 (16,3)	4 (9,5)	1 (2,2)	13 (28,9)	0

^a CLIN: clindamicina; CLOR: cloranfenicol; DOXI: doxiciclina; ERITRO: eritromicina; GENTA: gentamicina; LEVO: levofloxacina; RIFA: rifampicina; SULFA: sulfametoxazol; VANCO: vancomicina

^b A diferença da resistência para doxaciiclina aos antibióticos não β -lactâmicos entre os SCoN que o gene *mecA* e os SCoN que não tem o gene *mecA* não foi estatisticamente significativa

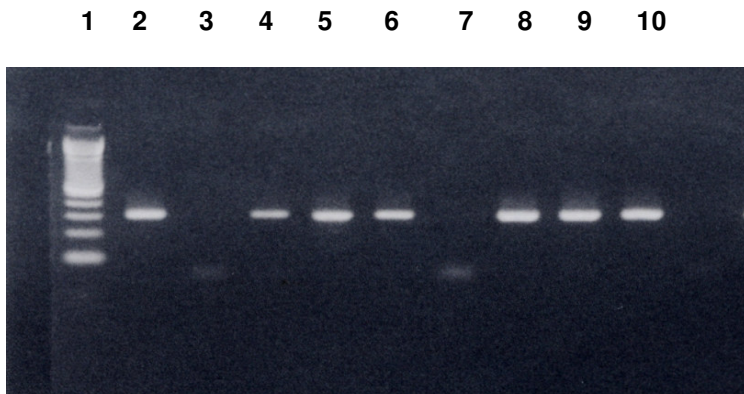


Figura 1: PCR para o gene *mecA*. Linha 1: marcador de peso molecular (100pb); linha 2: controle positivo *S. aureus* ATCC 33591; linha 3: controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228; linhas 4, 5 e 6: isolado número 173 (*S. epidermidis*) *mecA* positivo; linha 7: controle negativo; linhas: 8, 9 e 10: isolado número 110 (*S. capitis*) *mecA* positivo.

Distribution of *staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)* types I, II, III and IV in coagulase negative *Staphylococcus spp* from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado*, Keli Cristine Reiter, Rodrigo Minuto Paiva, Afonso Luis Barth

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Running Title: **Distribution of SCCmec in CoNS**

* Corresponding author. Mailing address:

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre – RS

Brasil – 90.035-903

Phone/FAX: +55 51 2101 8860

E-mail: abmachado@hcpa.ufrgs.br

SUMMARY

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are now recognized as etiological agents of disease with important range of pathogenicity in humans. Most developed countries have reported an increase in CoNS infection in hospitalized patients, which are resistant to methicillin and other antibiotics. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing is essential for understanding the molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus* spp. SCC*mec* elements are currently classified into types I to VI based on the characteristics of the *mec* and *ccr* genes complexes, and are further classified into subtypes according to their junkyard DNA region. We evaluated the distribution of SCC*mec* in CoNS from patients attending Hospital de Clínicas de Porto Alegre during two years (2004/2005). Among the 129 bloodstream isolates, 36 (27.9%) harbored SCC*mec* type I, 4 (3.0%) harbored SCC*mec* type II, 67 (52%) harbored SCC*mec* type III, 1 (0.8%) harbored SCC*mec* type IV and 4 (3.0%) harbored SCC*mec* type I and III. Seventeen isolates were not typeable. The identification of CoNS at species level indicated the *S. epidermidis* was the commonest specie with 87 isolates followed by *S. haemolyticus* (15 isolates), *S. hominis* (13), *S. capitis* (12) and *S. sciuri* (1). The SCC*mec* type III was the most prevalent among the isolates of *S. epidermidis* (52%). Among these strains, 30 (23%) harbored a modified SCC*mec* type III, which contained, in contrast to regular type III, an additional *dcs* region. SCC*mec* type III was also highly prevalent (75%) among *S. capitis*. The predominant SCC*mec* type found among *S. haemolyticus* was SCC*mec* type I. However, all four isolates harboring SCC*mec* type II belonged to *S. haemolyticus*. Our results indicate that the SCC*mec* type III was the most prevalent among the CoNS. The isolates with SCC*mec* type III were more resistant to non-beta lactams antimicrobials than the isolates harboring SCC*mec* type I, II and IV, although only for clindamicin ($p=0,021$), rifampin ($p=0,010$) and levofloxacin ($p= 0,005$) the resistance was statistically significant.

Abbreviations: CoNS, SCC*mec*, PCR, *ccr*.

INTRODUCTION

Coagulase negative *Staphylococcus* spp (CoNS), particularly *S. epidermidis*, are considered as the main pathogens of nosocomial bacteremia associated with catheter and neonatal sepsis (Krediet *et al.*, 2001, Krediet *et al.*, 2004). These infections are associated to high morbidity and mortality rate, mainly when CoNS are resistant to semi-synthetic beta-lactam antibiotics, such as methicillin. In fact methicillin-resistant *Staphylococcus* spp are a common cause of nosocomial infections worldwide (Wisplinghoff *et al.*, 2004, Favre *et al.*, 2005).

The resistance of CoNS to methicillin and other beta-lactam antibiotics is mediated by a penicillin-binding protein, which presents reduced affinity with these antibiotics (PBP2a). This protein is encoded by the *mecA* gene (Chambers *et al.*, 1988), inserted in a genomic island called staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) (Ito *et al.*, 2003). The SCC*mec* is a genetic mobile element which is a vehicle for exchanging resistance genes between staphylococcus species and is largely distributed among CoNS species and in *S. aureus* (Katayama *et al.*, 2001, Ito *et al.*, 1999, Hiramatsu *et al.*, 2004, Ito *et al.*, 2003).

The SCC*mec* was initially described as “*mec* DNA” which was found only in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and absent in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) (Ito *et al.*, 1999, Katayama *et al.*, 2000). This genetic element is constituted of different combinations between the *mec* complex, which encodes the resistance to methicillin, and the *ccr* complex, which encodes recombinases enzymes responsible for this genetic element mobility. This *mec* complex is composed of IS431, *mecA* and intact or truncated sequences of *mecI* and *mecR1* regulatory genes. The *ccr* complex can be composed by

recombinases genes *ccrA* and *ccrB* or *ccrC* (Ma *et al.*, 2002, Chongtrakool *et al.*, 2006, Ito *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2006, Kondo *et al.*, 2007). Based on such diversity, six types of *SCCmec* have already been described in *S. aureus*, and five types (I to V) have also been described in CoNS. Moreover community methicillin-resistant *S. epidermidis* (C-MRSE) were found with *SCCmec* type IV (Hisata *et al.*, 2005, Wisplinghoff *et al.*, 2003) and the fifth type of *SCCmec* (*SCCmec* V) has already been discovered in CoNS, particularly in *S. haemolyticus* (Ito *et al.*, 2004).

The structure and distribution of *SCCmec* types in *S. aureus* has been largely studied (Chongtrakool *et al.*, 2006, Hisata *et al.*, 2005, Hiramatsu *et al.*, 2004, Ito *et al.*, 2001, Katayama *et al.*, 2001), but data related to CoNS were only comparative, and in studies whose purpose was to determine whether there was a transmission between the species (Hanssen *et al.*, 2004, Hisata *et al.*, 2005). This study proposed to evaluate the distribution of *SCCmec* I, II, III and IV in methicillin-resistant CoNS, obtained from patients at a tertiary hospital in southern Brazil. Also was evaluated the distribution of *SCCmec* elements among the CoSN species and the standard of the resistance distribution of non-beta-lactamics antibiotics among 129 strains of methicillin-resistant CoNS and their corresponding *SCCmec*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates. A total of 129 clinical isolates of methicillin-resistant CoNS were obtained from blood cultures from 125 patients hospitalized at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, between August 2004 and December 2005. The study included only one clinical isolate per patient, or more than one isolated when they were obtained after a three days interval. The blood cultures were performed using

Bact Alert[®] (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) automated system, and subcultured on trypticase soy agar, containing 5% of sheep blood (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). The colony morphology, the Gram stain reaction, the catalase test and the absence of the coagulase enzyme were used as screening for CoNS identification.

Antimicrobial susceptibility test. The antimicrobial susceptibility test was performed by the disk diffusion method on Mueller Hinton Agar (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France), according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006), with the following antibiotic: oxacillin (1 µg), cefoxitin (30 µg), vancomycin (30 µg), gentamicin (10 µg), clindamycin (2 µg), chloramphenicol (30 µg), doxycycline (30 µg), erythromycin (15 µg), levofloxacin (5 µg), rifampin (5 µg) and co-trimoxazole (25 µg). *S. aureus* ATCC 25923 was used for quality control.

DNA extraction and quantification. The isolates were cultured on Mueller Hinton Agar and incubated at 35°C for 18 to 24 hours. A bacterial suspension equivalent to 1.0 McFarland was prepared in 500 µl of 10mM TRIS – 1mM EDTA (pH 8.0). The suspension was homogenized in vortex and heated at 100°C for 10 minutes (York *et al.*, 1996). Afterwards, the suspension was frozen at -20°C for two hours and then centrifuged at 9,000 g for 3 min. The DNA from non-typeable isolates and in 20 random isolates, DNA was quantified using GeneQuant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech's, Piscataway, USA). Non-typeable isolates were submitted to thermal lyses and then extracted using QIAamp kit for tissues (Qiagen[®], Valencia, US), according to the manufacturer's instructions.

Species identification. The molecular identification of *S. epidermidis* was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR), with primers from a species-

specific probe for the identification of *tuf* gene (Martineau *et al.*, 1996). The isolates that were not identified as *S. epidermidis* were submitted to the API ID 32 STAPH (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) semi-automated system.

Determination of *mecA* gene. PCR for *mecA* gene was performed according to the protocol that was previously described by Vannuffel *et al* (1995). *S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. aureus* ATCC 33591 were used as negative and positive controls.

Determination of *SCCmec* type. The *SCCmec* type was determined by a multiplex PCR which included four pairs of primers for loci A, B, D and E (Oliveira & Lencastre, 2002). Locus A is exclusive to *SCCmec* type I and amplifies a region of *pls* gene, locus B is exclusive to *SCCmec* type II and amplifies an internal region of *kpd* operon. Locus D is common to *SCCmec* types I, II and IV and amplifies a region of *dcs* gene. Locus E is exclusive to *SCCmec* type III and amplifies a region between integrated plasmid pI258 and transposon Tn554 (Fig.1) In addition, a single PCR for each locus was standardized in order to check results of 30 isolates which amplified locus E and D and the results of the non-interpretable types obtained by multiplex PCR.

Multiplex PCR was performed in 50 µl of reaction volume with 1 X enzyme buffer (JMR Holdings, London, United Kingdom), 1.25 U Taq polymerase DNA (Super-Therm, JMR Holdings, London, United Kingdom) 200 µM dNTP mix (ABgene®, Epsom, UK), 10 pmol of CIF2 F2 and CIF2 R2 primer, 6 pmol of KDP F1 and KDP R1 primers, 5 pmol of DCS F2 and DCS R1 primers and 5 pmol of RIF4 F3 and RIF4 R9 primers (Invitrogen®, Carlsbad, USA), and 10 µl of extracted DNA. The

amplification process was performed using a MJ Research PTC 100 Thermocycler (MJ Research™, Waltham, USA). Each single PCR was performed in 25 µl of reaction volume following the same protocol as for multiplex PCR.

The cycle sequencing reactions were performed at 92°C for 3 min, followed by 30 cycles of 92°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 1 min e 30 s, for both protocols. PCR product was detected on agarose gel at 2% and stained with ethidium bromide.

Sequencing and computer analysis of sequences: The nucleotide sequence of loci A, B, D, E and *mecA* gene was determined. A homology search was performed with BLAST and Chromas programs and DDBJ/EMBL/GeneBank databases.

Statistical analysis: The chi-square test with a 0.05 significance level was used for statistical analysis. A descriptive statistical analysis was performed to evaluate the relationship between the susceptibility test and SCC*mec* type.

RESULTS AND DISCUSSION

Wide distribution of *mecA* gene in CoNS species has been demonstrated by previous studies (Pierre *et al.*, 1990) and was confirmed in this study with CoNS clinical isolates belonging to five species. This study also described the distribution of the SCC*mec* types I, II, III and IV among a population of CoNS from blood cultures obtained from patients at a tertiary hospital.

The presence of *mecA* gene was tested in all 129 isolates of methicillin-resistant CoNS by the PCR technique using specific primers and all isolates

presented positive results. Sequencing of the amplified fragment of *mecA* gene from one clinical sample presented 100% of homology with *mecA* gene sequence for *S. aureus* with D86934 accession number in *GenBank*, demonstrating that this gene is well-conserved in staphylococcus species (Ito *et al.*, 2001). This isolate was used as positive control in all PCR tests.

It was possible to determine an agreement of 100% and 97% of the diffusion disk (DD) testing with cefoxitin and oxacillin, respectively, with the presence of *mecA* gene, detected by PCR in all 129 samples. According to the literature, the DD test with cefoxitin substrate is preferred over the DD test with oxacillin to estimate the resistance to oxacillin mediated by *mecA* gene, for both *S. aureus* and CoNS (Swenson *et al.*, 2005). This was also observed in this study.

The identification of CoNS species was performed in two stages. First, all 129 isolates were submitted, for the identification using a specie-specific primer for the *tuf* gene, and 87 (67.4%) of the isolates were identified as *S. epidermidis*. The remaining 42 isolates were submitted to the identification by a the semi-automated system, resulting in 15 (11.6%) *S. haemolyticus*, 13 (10%) *S. hominis*, 12 (9.3%) *S. capitis*, 1 (0.8%) *S. sciuri* and one isolate could not be identified. These are methicillin-resistant CoNS species, usually found in clinical microbiology laboratory (Caeirão *et al.*, 2006, York *et al.*, 1996, Silva *et al.*, 2002).

The PCR multiplex for the four SCC*mec* types (I, II, III and IV) identified 36 (28%) isolates with SCC*mec* type I, 4 (3.0%) isolates with as SCC*mec* type II, 67 (52%) isolates with SCC*mec* type III, among these 30 (23%) harbored a modified SCC*mec* type III, which contained, in contrast to regular type III, 1 (0.8%) isolate with SCC*mec* type IV and 4 (3.0%) isolates positive for two SCC*mec* types: I and III.

(Fig.1). Seventeen isolates (13%) were not typeable by the method employed (Table 1). These results are comparable to the distribution of *SCCmec* types among staphylococci in other study (Chung *et al.*, 2004). Differently, the *SCCmec* type IV was the most prevalent in a report on hospital isolates of *S. epidermidis* (Wisplinghoff *et al.*, 2003).

Non-typeable CoNS were tested by PCR using single primers for the four loci, but we were not able to establish the *SCCmec* type of these isolates. Most (59%) of the not-typeable isolates were identified as *S. hominis*.

The relatively high number of isolates non-typeable may be due to the fact that a few types of *SCCmec* II do not have the *kpd* operon in the junkyard region and, therefore they cannot be identified as *SCCmec* type II using this multiplex PCR (Shore *et al.*, 2005). Moreover Shore *et al.*, (2005) described a variant of *SCCmec* type IV which did not present locus D, of the *dcs* region and name it as *SCCmec* type IV-*dcs*. We can also consider that non-typeable strains could be *SCCmec* type IV-*dcs*. The variability in the identification of *SCCmec* can also be explained by the presence of new structures or rearrangements and recombinations of *mec* element (Chung *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005).

The distribution of the *SCCmec* types among the *S. epidermidis* indicated that 25 (19%) isolates harbored *SCCmec* type I and 24 (18.6%) harbored *SCCmec* type III. It is of note that 30 (23%) isolates harbored *SCCmec* type III and locus D (*dcs* region). All isolates with this profile were identified as *S. epidermidis*, and this may indicated the existence of a clonal relation, among these isolates. These results warrant further studies using another molecular typing technique. It was possible to identify only 1 (0.8%) isolate with *SCCmec* type IV. On the other hand 4 (3.1%)

isolates amplified the loci for SCC*mec* types I and III and were considered as non-interpretable.

Thirty isolates of *S. epidermidis* which harbored SCC*mec* type III (locus E) and *dcs* region (locus D) were tested again by single PCR for locus D and locus E. This PCR reaction confirming the amplification of both loci in all of them. The presence of locus D (*dcs* region) is not exclusive to types SCC*mec* I, II and IV. Chongtrakool *et al.* (2006) identified 39 isolates with locus D and SCC*mec* type III. This profile was also found in other studies. In order to investigate the nature of these cassettes, genes of *ccr* complex were characterized, and it was shown that a few isolates with typical SCC*mec* type III also amplified the locus D and contained *ccrAB3* type (Aires de Sousa & Lencastre, 2003, Budimir *et al.*, 2006, Qi *et al.*, 2005).

Among the 15 isolates of *S. haemolyticus*, 10 (7.8%) harbored SCC*mec* type I, 4 (3.1%) harbored SCC*mec* type II and 1 (0.8%) isolate harbored a SCC*mec* type which could not be identified. Among the 13 CoNS identified as *S. hominis*, the SCC*mec* type identification could not be performed in 10 (7.8%) isolates, and only 3 (2.3%) were identified as SCC*mec* type III. Among the 12 isolates classified as *S. capitis*, 1 (0.8%) harbored SCC*mec* type I, 9 (7%) harbored SCC*mec* type III, but it was not possible to identify the SCC*mec* type in 2 (1.5%) isolates.

The molecular techniques, such as multilocus sequence typing (MLST), SCC*mec* typing and others, have shown that most nosocomial MRSA infections are caused by few pandemic clones. Among the five MRSA representative pandemic types characterized by MLST is the Clonal Complex 8 (CC8), which includes the Brazilian clone (ST 239) with the SCC*mec* IIIA (Shore *et al.*, 2005, Robinson *et al.*, 2003). The hypothesis of SCC*mec* transfer between species of staphylococci may

contribute to the fact that the CoNS isolates of this study, prevalently identified as SCCmec III, are related to the presence of this MRSA pandemic clone coexisting in our institution (data not shown).

The hypothesis of SCCmec transfer between *S. epidermidis* and *S. aureus* is based on several evidences. Hanssen *et al.* (2004) found genetically unique MRSA, containing variants of *ccrAB* genes that are identical to those found in methicillin-resistant CoNS. It seems that *S. aureus* and CoNS present the same pool of genes, containing resistance and recombinase genes; however, it is still necessary to define the resistance transfer mechanisms and routes between staphylococci.

Sequencing of amplified loci to identify SCCmec types I, II, III and IV presented 100% homology. The differences were only in punctual nucleotides in one of the two strands. The amplicons were compared to the *GenBank* sequences with accession numbers AB033763 for SCCmec type I, D86934 for SCCmec type II, AB037671 for SCCmec type III and AB033763 for SCCmec type IV. These isolates were used as positive controls in the PCR reactions. The two selected isolates that amplified SCCmec type III and locus D presented 100% homology with AB063173 *GenBank* sequence for locus D, but only 96% of homology for SCCmec type III (AB037671 *GenBank* sequence) (Oliveira *et al.*, 2002)

A descriptive analysis of resistance was performed for the susceptibility profile of CoNS to non-beta-lactam antimicrobials among SCCmec types (Table 2). According to the literature the isolates harboring SCCmec type III present a high number of resistance genes (Ito *et al.*, 1999, Ito *et al.*, 2001). In these study we also found isolates with SCCmec III to be more resistant to non- β -lactamics antibiotics,

but this difference was not statistically significant to most antibiotics (erythromycin $p = 0.171$, doxacycline $p = 0.982$, co-trimoxazole $p = 0.115$, gentamicin $p = 0.860$ and chloramphenicol $p = 0.358$), except for rifampin (rifampin $p = 0.010$), levofloxacin (levofloxacin $p=0.005$) and clindamycin (clindamycin $p = 0.012$).

CoNS are reservoirs of resistance genes and probably are able to transmit these genes to *S. aureus*. The similarity of SCCmec among *S. aureus* and CoNS suggests the horizontal transmission between the species of staphylococcus. In addition, the extensive rearrangement observed in *ccr* and *mec* complexes indicate the frequent exchange of genetic material (Hanssen *et al.*, 2006).

Noteworthy, the SCCmec type IV was first identified in *S. epidermidis* in 1970 and only after around ten years this SCCmec was described in *S. aureus* (Wisplinghoff *et al.*, 2003). One could consider, therefore, that the Brazilian epidemic clone MRSA is widespread geographically and harbored the SCCmec III, this resistance may be originated from the CoNS (Da Silva *et al.*, 2000).

The most relevant aspect is that SCCmec type III encodes the highest number of resistance genes, and this information is epidemiologically important for the institutional infection control. Traditionally, CoNS were recognized as bacteria of minor clinical importance. However, with the current knowledge, it is known that they can be considered a determinant factor in the generation of new MRSA strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos at Hospital de Clínicas de Porto Alegre to support this work.

REFERENCES

- Aires de Sousa, M., de Lencastre, H. (2003).** Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J Clin Microbiol* **41**, 3806-15.
- Budimir, A., Deurenberg, R. H., Plecko, V., Vink, C., Kalenic, S., Stobberingh, E. E. (2006).** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. *J Antimicrob Chemother* **57**,331-334.
- Caierao, J., Superti, S., Dias, C. A., d'Azevedo, P. A. (2006).** Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 277-80.
- Chambers, H. F. (1988).** Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **1**, 173-86.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X. X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J. H., Hiramatsu, K. (2006).** 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* **50**, 1001-1012.
- Chung, M., Dickinson, G., De Lencastre, H., Tomasz, A. (2004).** International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol* **42**, 542-7.
- Da Silva Coimbra MV, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, Vay C, Klan L, Figueiredo AM. (2000).** Spread of the Brazilian

epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol*. Feb; 49(2):187-92.

Deurenberg, R. H., Vink, C., Oudhuis, G. J., Mooij, J. E., Driessen, C., Coppens, G., Craeghs, J., De Brauwer, E., Lemmen, S., Wagenvoort, H., Friedrich, A. W., Scheres, J., Stobberingh, E. E. (2005). Different clonal complexes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine region. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4263-71.

Favre, B., Hugonnet, S., Correa, L., Sax, H., Rohner, P., Pittet, D. (2005) Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**, 697-702.

Hanssen, A. M., Ericson Sollid, J. U. (2006). SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**, 8-20.

Hanssen, A. M., Kjeldsen, G., Sollid, J. U. (2004). Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 285-96.

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

Hiramatsu, K., Watanabe, S., Takeuchi, F., Ito, T., Baba, T. (2004). Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **6**, S5-8.

Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal

cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1323-36.

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

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

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

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

Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1955-1963.

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 264-74.

- Krediet, T. G., Jones, M. E., Janssen, K., Gerards, L. J., Fleer A. (2001).** Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* **39**, 3376-3378.
- Krediet, T. G., Mascini, E. M., van Rooij, E., Vlooswijk, J., Paauw, A., Gerards, L. J., Fleer, A. (2004).** Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* **42**, 992-995.
- Ma, X. X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R. S., Hiramatsu, K. (2002)** Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1147-1152.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G. (1996).** Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **34**, 2888-2893.
- CLSI. 2006.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing forty two informational supplement M100-S16. CLSI Wayne, PA.
- Oliveira, D. C., Milheirico C., de Lencastre H. (2006).** Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3457-3459.
- Oliveira, D. C., de Lencastre, H. (2002).** Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2155-2161.

Pierre, J., Williamson, R., Bornet, M., Gutmann, L. (1990). Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* with a low affinity for methicillin, cephalothin, and cefamandole. *Antimicrob Agents Chemother* **34**1691-1694.

Qi, W., Ender, M., O'Brien, F., Imhof, A., Ruef, C., McCallum, N., Berger-Bachi, B. (2005). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV *SCCmec* and a new *SCCmec* element associated with isolates from intravenous drug users. *J Clin Microbiol* **43**, 5164-5170.

Robinson, D. A. & Enright, M. C. (2003). Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3926-3934.

Shore, A., Rossney, A. S., Keane, C. T., Enright, M.C, Coleman, D. C. (2005). Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2070-2083.

Silva, G. D., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, R. C., Wilkinson, A. R., Day, N. P., Peacock, S. J. (2002) .The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**, 382-8.

Swenson, J, M., Tenover, F, C; Cefoxitin Disk Study Group. (2005). Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* **43**, 3818-3823.

Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G., Gala. J. L. (1995). Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **33**, 2864-2867.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., Edmond M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**, 309-317.

Wisplinghoff, H., Rosato, A. E., Enright, M. C., Noto, M., Craig, W., Archer, G. L. (2003). Related clones containing *SCCmec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3574-3579.

York, M. K., Gibbs, L., Chehab, F., Brooks, G. F. (1996). Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **34**, 249-253.

Zhang, K., McClure, J. A., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J. M. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**, 5026-5033.

Table 1: Distribution of SCCmec elements among the coagulase negative *Staphylococcus* spp

SCCmec type	Total (%)	N° (%) of coagulase negative, methicillin-resistant <i>Staphylococcus</i> spp strains (n= 129)					
		<i>S.epidermidis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.capitis</i>	<i>S.sciuri</i>	NI†
I	36 (28)	25 (19.4)	0	10 (7.8)	1 (0.8)	0	0
II	4 (3)	0	0	4 (3.1)	0	0	0
III	37 (29)	24 (18.6)	3 (2.3)	0	9 (7)	1 (0.8)	0
IV	1 (0,8)	1 (0.8)	0	0	0	0	0
I and III	4 (3)	4 (3.1)	0	0	0	0	0
III and IV	30(23)	30 (23.2)	0	0	0	0	0
NT*	17 (13)	3 (2.3)	10 (7.8)	1 (0.8)	2 (1.5)	0	1 (0.8)

*NT: non-typeable, †NI: not identified

Table 2: Standard of the resistance distribution of non-beta-lactamics antibiotics among 129 strains of methicillin-resistant CoNS and their corresponding *SCCmec*

SCCmec type	Total	N°(%) of resistance among methicillin-resistant <i>Staphylococcus spp</i> [†]								
		CLIN ^{††}	CHLOR	DOXI	ERYTHRO	GENTA	LEVO ^{††}	RIFA ^{††}	CO-TRI	VANCO
I	36	24(66.6)	18(50)	12(33.3)	28(71.4)	33(91.7)	14(38.9)	10(27.8)	24(66.6)	0
II	4	1(25)	0	0	1(25)	2(50)	1(25)	0	1(25)	0
III	67	48(73.8)	25(39.1)	8(12.5)	49(75.4)	58(89.2)	43(70.5)	21(32.3)	51(78.5)	0
IV	1	1(100)	0	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0
NT*	17	6(37.5)	5(31.3)	5(31.3)	10(62.5)	13(81.3)	5(37.5)	3(18.8)	13(81.3)	0

*NT: non-typeable

[†]CLIN: clindamycin; CHLOR: chloramphenicol; DOXI, doxycycline; ERYTHRO: erythromycin; GENTA: gentamicin; LEVO: levofloxacin; RIFA: rifampin; CO-TRI: co-trimoxazole; VANCO: vancomycin

^{††} The difference of resistance to non β -lactamics antimicrobials among CoNS which harbored *Sccmec* III versus the CoNS which harbored *SCCmec* I, II and IV was not statistically significant, except to rifampin (p= 0,010), levofloxacin (p= 0,005) and clindamycin (p= 0,012).

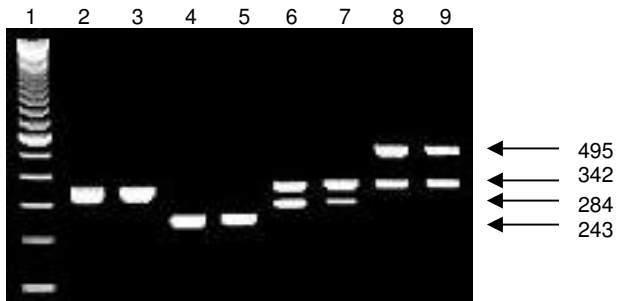


Figure 1: PCR Multiplex for SCCmec type from CoNS. Lane 1: molecular weight standard (100pb); lines 2 and 3: isolate number 173 (*S. epidermidis*) harboring SCCmec IV (342 pb); lanes 4 and 5: isolate number 110 (*S. capitis*) harboring SCCmec III (243 pb); lanes 6 and 7: isolate number 109 (*S. haemolyticus*) harboring SCCmec II (342 and 284 pb); lanes 8 and 9: isolate number 111 (*S. epidermidis*) harboring SCCmec I (342 and 495 pb).

Distribuição dos *staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)* tipos I, II, III e IV nos *Staphylococcus spp* coagulase negativa de pacientes assistidos em um hospital terciário no sul do Brasil

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, Keli Cristine Reiter, Rodrigo Minuto Paiva, Afonso Luis Barth

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Running Title: Distribuição dos *SCCmec* nos SCoN

* Corresponding author. Mailing adress:

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre – RS

Brasil – 90.035-903

Phone/FAX: +55 5121018860

E-mail: abmachado@hcpa.ufrgs.br

SUMMARY

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are now recognized as etiological agents of disease with important range of pathogenicity in humans. Most developed countries have reported an increase in CoNS infection in hospitalized patients, which are resistant to methicillin and other antibiotics. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing is essential for understanding the molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus* spp. SCC*mec* elements are currently classified into types I to VI based on the characteristics of the *mec* and *ccr* genes complexes, and are further classified into subtypes according to their junkyard DNA region. We evaluated the distribution of SCC*mec* in CoNS from patients attending Hospital de Clínicas de Porto Alegre during two years (2004/2005). Among the 129 bloodstream isolates 36 (27.9%) harbored SCC*mec* type I, 4 (3.0%) harbored SCC*mec* type II, 67 (52%) harbored SCC*mec* type III, 1 (0.8%) harbored SCC*mec* type IV and 4 (3.0%) harbored SCC*mec* type I and III. Seventeen isolates were not typeable. The identification of CoNS at species level indicated the *S. epidermidis* was the commonest species with 87 isolates followed by *S. haemolyticus* (15 isolates), *S. hominis* (13), *S. capitis* (12) and *S. sciuri* (1). The SCC*mec* type III was the most prevalent among the isolates of *S. epidermidis* (52%). Among these strains, 30 (23%) harbored a modified SCC*mec* type III, which contained, in contrast to regular type III, an additional *dcs* region. SCC*mec* type III was also highly prevalent (75%) among *S. capitis*. The predominant SCC*mec* type found among *S. haemolyticus* was SCC*mec* type I. However, all four isolates harboring SCC*mec* type II belonged to *S. haemolyticus*. Our results indicate that the SCC*mec* type III was the most prevalent among the CoNS. The isolates with SCC*mec* type III were more resistant to non-beta lactamics antimicrobials than the isolates harboring SCC*mec* type I, II and IV, although only for clindamicin ($p=0,021$), rifampin ($p=0,010$) and levofloxacin ($p= 0,005$) the resistance was statistically significant.

Keywords: CoNS, SCCmec, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*.

INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* spp coagulase negativa (SCoN), especialmente os *S. epidermidis*, são considerados os principais patógenos de bacteremias nosocomiais associadas a cateter e sepse neonatal (Kredit *et al.*, 2001, Kredit *et al.*, 2004). Estas infecções estão associadas a importante morbidade e mortalidade, principalmente quando os SCoN são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos como a meticilina. Os *Staphylococcus* spp meticilina resistente são causa comum de infecções nosocomiais em todo mundo (Wisplinghoff *et al.*, 2004, Favre *et al* 2005).

A resistência dos SCoN à meticilina e outros antibióticos β -lactâmicos é mediada por uma proteína ligadora de penicilina a qual apresenta reduzida afinidade por estes antibióticos beta lactâmicos (PBP2a). Esta proteína é codificada pelo gene *mecA* (Chambers *et al.*, 1988), inserido em uma ilha genômica denominada *staphylococcal cassette chromossome mec* (SCCmec) (Ito *et al.*, 2003). O SCCmec é um elemento genético móvel que serve como veículo de troca de genes de resistência entre as espécies de estafilococos e está amplamente distribuído entre as espécies de SCoN e nos *S. aureus* (Katayama *et al.*, 2001, Ito *et al.*, 1999, Hiramatsu *et al.*, 2004, Ito *et al.*, 2003).

Inicialmente, o SCCmec foi descrito como “*mec DNA*” encontrado apenas nos *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e ausente nos *Staphylococcus aureus* meticilina sensíveis (MSSA) (Ito *et al.*, 1999, Katayama *et al.*, 2000) Este elemento genético pode conter diferentes combinações entre o complexo *mec*, que codifica a resistência a meticilina e o complexo *ccr* que codifica as enzimas

recombinases responsáveis pela mobilidade deste elemento genético. O complexo *mec* é composto por IS431, *mecA* e seqüências intactas ou truncadas dos genes regulatórios *mecI* e *mecR1*. O complexo *ccr* pode ser composto pelos genes das recombinases *ccrA* e *ccrB* ou *ccrC*. (Ma *et al.*, 2002, Chongtrakool *et al.*, 2006, Ito *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2006, Kondo *et al.*, 2007). Baseado nesta diversidade seis tipos deste elemento já foram descritos em *S. aureus*, mas os tipos (I a V), também já foram descritos nos SCoN. Além disso, foram encontrados *S.epidermidis* comunitários meticilina resistentes (C-MRSE) com o SCC*mec* tipo IV (Hisata *et al.*, 2005, Wisplingdorff *et al.*, 2003) e o quinto tipo de SCC*mec* (SCC*mec* V) já foi encontrado entre os SCoN especialmente nos *S. haemolyticus* (Ito *et al.*, 2004).

A estrutura e distribuição dos tipos de SCC*mec* em *S. aureus* é amplamente estudada, (Chongtrakool *et al.*, 2006, Hisata *et al.*, 2005, Hiramatsu *et al.*, 2004, Ito *et al.*, 2001, Katayama *et al.*, 2001), porém para os SCoN os dados são apenas comparativos e em estudos que visam determinar se houve ou não transmissão entre as espécies (Hansen *et al.*, 2004, Hisata *et al.*, 2005). Este estudo propôs avaliar a distribuição em SCC*mec* I, II, III e IV nos SCoN resistentes à meticilina obtidos de pacientes em um hospital terciário do sul do Brasil. Também foi avaliada a distribuição dos elementos SCC*mec* entre as espécies de SCoN e o padrão da distribuição da resistência aos antibióticos não β -lactâmicos entre as 129 cepas resistentes de SCoN resistentes e seus SCC*mec* correspondentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados Bacterianos. Um total de 129 isolados clínicos de SCoN resistentes à meticilina obtidos de hemoculturas de 125 pacientes internados no

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre agosto de 2004 e dezembro de 2005. Foi incluído no estudo um isolado clínico de hemocultura por paciente, ou mais de um isolado quando obtido após um intervalo de três dias. As hemoculturas foram realizadas em sistema automatizado Bact Alert[®] (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França) e subcultivadas em agar tripticaseína de soja contendo 5% de sangue de carneiro (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França). A morfologia da colônia, a coloração pelo método de Gram, o teste da catalase e a ausência da enzima coagulase foram utilizados como métodos de identificação para triagem de SCoN.

Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. (TSA) O TSA foi executado em Agar Mueller Hinton (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França), segundo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2006), com os seguintes antibióticos: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), doxacilina (30 µg), eritromicina (15 µg), levofloxacina (5 µg), rifampicina (5 µg), sulfametoxazol (25 µg). A cepa padrão utilizada para o controle de qualidade foi *S. aureus* ATCC 25923.

Extração e quantificação do DNA. Os isolados foram cultivados em Agar Mueller Hinton em ambiente aeróbico a 35 °C por 18 a 24 horas. Uma suspensão bacteriana equivalente a 1,0 na escala de McFarland foi preparada em 500 µl de 10mM TRIS – 1mM EDTA (pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e aquecida a 100 °C por 10 minutos (York *et al.*, 1996). Após, a suspensão foi congelada a -20 °C por duas horas e então centrifugada a 9.000 g por 3 min. O DNA de todos os isolados não tipáveis e de 20 isolados aleatórios foi quantificado utilizando o GeneQuant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotec's,

Pistacaway, USA). Os isolados não tipáveis foram submetidas à lise térmica e depois extraídas pelo kit QIAamp para tecidos (Qiagen[®], Valencia, US) conforme instruções do fabricante.

Identificação das espécies. A identificação molecular da espécie *S. epidermidis* foi feita pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), com *primers* a partir de uma sonda espécie-específica para a identificação do gene *tuf* (Martineau *et al*, 1996). Os isolados que não foram classificados como *S. epidermidis* foram submetidos à identificação pelo sistema semi-automatizado API ID 32 STAPH (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França).

Determinação do gene *mecA*. O PCR para o gene *mecA* foi executado segundo protocolo previamente descrito por Vanuffel *et al* (1995). *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 33591 foram utilizados como controles negativo e positivo.

Determinação do tipo de *SCCmec*. Os tipos de *SCCmec* foram determinados por PCR multiplex com quatro pares de *primers* para os lócus A, B, D e E (Oliveira & Lencastre, 2002). O locus A é exclusivo do *SCCmec* tipo I, amplifica uma região do gene *pls*, o locus B é exclusivo para o *SCCmec* II e amplifica uma região interna ao *kpd* operon. O locus D é comum aos tipos *SCCmec* I, II e IV e amplifica uma região do gene *dcs*. O locus E é exclusivo para o tipo *SCCmec* tipo III e amplifica uma região entre o plasmídeo integrado pl258 e o transposomo Tn554. Foi padronizado também um PCR simples para cada locus a fim de confirmar os resultados de 30 isolados que amplificaram o locus D e E e para os resultados dos isolados não interpretáveis pelo multiplex PCR.

O multiplex PCR foi realizado em 50 µl de volume de reação com 1 X tampão da enzima (JMR Holdings, London United Kindom), 1,25 U Taq de DNA polimerase (Super-Therm, JMR Holdings, London United Kindom) 200 µM dNTP mix (ABgene®, Epsom, UK), 10 pmol do primer CIF2 F2, CIF2 R2, 6 pmol do primer KDP F1 e KDP R1, 5 pmol dos primers DCS F2 e DCS R1 e RIF4 F3 e RIF4 R9 (Invitrogen®, Carlsbad, USA), e 10 µl de DNA extraído. A amplificação foi executada em Termociclador MJ Research PTC 100 (MJ Research™, Waltham, USA). O PCR simples foi realizado em 25 µl de volume de reação com o mesmo protocolo do PCR multiplex. Os seguintes parâmetros foram utilizados: 92 °C por 3 min, 30 ciclos de 92 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 30 s, para ambos os protocolos. O produto do PCR foi revelado em gel de agarose a 2% e visualizado com brometo de etídeo.

Sequenciamento e análise das seqüências: Utilizando os fragmentos de DNA amplificados por PCR a seqüência de nucleotídeos foi determinada para os lócus A, B, D, E e para o gene *mecA*. A homologia das seqüências foi determinada pelos programas BLAST, Chromas e pelos dados do DDBJ/EMBL/GeneBank.

Análise estatística: O teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 0,05, foi utilizado para as análises estatísticas. Uma análise estatística descritiva foi utilizada para comparar a suscetibilidade aos antimicrobianos não β-lactâmicos e o tipo de *SCCmec*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição do gene *mecA* entre as espécies de SCoN foi demonstrada em estudos prévios (Pierre *et al.*, 1990) e foi confirmada neste estudo com a presença do gene determinada em cinco espécies. Neste estudo também foi descrita a distribuição dos principais tipos de SCC*mec* I, II, III, IV em uma população de SCoN isolados de hemoculturas de paciente de um hospital terciário.

A presença do gene *mecA* foi testada para os 129 isolados de SCoN resistentes à meticilina pela técnica de PCR usando *primers* específicos e todos isolados apresentaram resultados positivos. O sequenciamento de um fragmento amplificado do gene *mecA*, de uma amostra clínica apresentou 100% de homologia com a seqüência do gene *mecA* para o *S. aureus* com o número de acesso D86934 no *GenBank*. Demonstrando que este gene é bem conservado entre as espécies de estafilococos (Ito *et al.*, 2001). Este isolado, então, foi utilizado como controle positivo para todos os testes.

Foi possível determinar uma concordância de 100% e 97% do teste de disco difusão (DD) com cefoxitina e oxacilina, respectivamente, com a presença do gene *mecA* detectada por PCR para as 129 amostras. De acordo com a literatura o teste de DD com substrato de cefoxitina é melhor do que o teste de DD com oxacilina, para prever a resistência a oxacilina mediada pelo gene *mecA*, tanto para *S. aureus* como para SCoN (Swenson *et al*, 2005). Este padrão descrito para o DD também foi verificado neste estudo.

A identificação das espécies dos SCoN foi realizada em duas etapas. Primeiro todos 129 isolados foram submetidos a identificação utilizando *primers* para o gene *tuf* espécie-específico e 87 (67,4%) isolados foram identificados como *S. epidermidis*. Os 42 isolados restantes foram submetidos à identificação pelo

sistema semi-automatizado resultando em 15 (11,6%) *S. haemolyticus*, 13 (10%) *S. hominis*, 12 (9,3%) *S. capitis*, 1 (0,8%) *S. sciuri* e um isolado não pode ser identificado. Estas são espécies de SCoN resistentes à meticilina, usualmente encontradas em laboratório de microbiologia clínica (Caeirão *et al*, 2006, York *et al*. 1995, Silva *et al.*, 2002).

O multiplex PCR para os quatro tipos de *SCCmec* (I, II, III, e IV), identificou 36 (28%) isolados para o *SCCmec* tipo I, 4 (3,0%) isolados foram identificados como *SCCmec* tipo II, 67 (52%) SCoN com o elemento genético móvel do tipo *SCCmec* III, entre estes, 30 (23%) isolados continham uma região *dcs* adicional, não encontrada usualmente nos *SCCmec* tipo III, 1 (0,8%) isolados pertenciam ao tipo *SCCmec* IV e 4 (3,0%) foram positivos para dois tipos de *SCCmec*, os tipos I e III (Figura 1). Dezesete isolados (13%) foram não tipáveis com o método usado (Tabela 1). Esta percentagem é comparável as que foram encontradas em outro estudo (Chung *et al.*, 2004). Diferentemente, o *SCCmec* tipo IV foi o mais prevalente em isolados nosocomiais de *S. epidermidis*. (Wisplinghoff *et al*, 2003).

Os SCoN não tipáveis foram testados em PCR utilizando primers isolados para os quatro loci, mas não foi possível identificar o tipo de *SCCmec* para estes isolados. A maioria (59%) destes isolados era da espécie *S. hominis*.

O número relativamente alto de isolados não tipáveis pode ser devido ao fato de alguns tipos de *SCCmec* II não possuírem ao *kpd* operon na região "J", desta forma não podem ser identificados por este multiplex PCR (Shore *et al.*, 2005). Shore e colaboradores (2005) também descreveram uma variante do *SCCmec* tipo IV e que não apresenta da região *dcs* e nomearam este tipo como *SCCmec* tipo IV-*dcs*. Poderíamos A variabilidade do grau de identificação do tipo de *SCCmec* pode

ser devida também a presença de novas estruturas ou rearranjos e recombinações do elemento *mec*. (Chung *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005).

A distribuição dos *SCCmec* entre os *S. epidermidis* 87 (67%) indicou 25 (19%) isolados como *SCCmec* tipo I, 24 (18,6%) como *SCCmec* tipo III, 30 (23,2%) foram identificados *SCCmec* tipo III, mas amplificaram também o locus D (região *dcs*). Todas as cepas com este perfil foram identificadas como *S. epidermidis*, o que nos permite supor a existência de uma relação clonal entre estes isolados. Estes resultados necessitam estudos posteriores utilizando outra técnica de tipagem molecular. Foi possível identificar somente 1 (0,8%) isolado como *SCCmec* tipo IV. E 4 (3,1%) isolados amplificaram os locus para os tipos de *SCCmec* I e III e foram considerados não interpretáveis.

Os *S. epidermidis* (30) identificados como *SCCmec* tipo III (locus E) e que amplificaram a região *dcs* (locus D) foram testados novamente por PCR simples para o locus D e para o locus E. Todos isolados confirmaram a amplificação dos dois locus. A presença do locus D (região *dcs*) não é exclusiva aos tipos *SCCmec* I, II e IV, Chongtrakool e colaboradores identificaram 39 isolados com o locus D e *SCCmec* tipo III. Este perfil também foi encontrado em outros estudos. Para investigar a natureza destes cassetes foram caracterizados os genes do complexo *ccr*, foi demonstrado que alguns isolados com *SCCmec* tipo III também amplificam o locus D e contém o complexo *ccrAB3* (Aires de Sousa & Lencastre, 2003, Budimir *et al.*, 2006, Qi *et al.*, 2005).

Entre os 15 isolados de *S. haemolyticus* 10 (7,8%) pertenciam ao *SCCmec* tipo I, 4 (3,1%) foram identificados com *SCCmec* tipo II e em 1 (0,8%) isolado o tipo de *SCCmec* não pode ser identificado. Entre os 13 SCoN identificados como *S.*

hominis não foi possível identificar o tipo de SCCmec em 10 (7,8%) isolados, e apenas 3 (2,3%) foram identificados como SCCmec tipo III. Entre os 12 isolados classificados como *S. capitis* 1 (0,8%) foi identificado como SCCmec tipo I, 9 (7%) como SCCmec tipo III, porém não foi possível identificar o tipo de SCCmec em dois (1,5%) isolados.

As técnicas moleculares como o *multilocus sequence typing* (MLST), tipagem do SCCmec e outras, têm demonstrado que a maioria das infecções por MRSA nosocomiais é causada por poucos clones pandêmicos. Entre as cinco linhagens pandêmicas representativas de MRSA, caracterizadas por MLST, está o Complexo Clonal 8 (CC8) que inclui o clone Brasileiro (ST 239) e o SCCmec IIIA (Shore *et al.*, 2005, Robinson *et al.*, 2003). A hipótese da transferência do SCCmec entre as espécies, pode contribuir para supormos que os isolados de SCoN deste estudo, identificados prevalentemente como SCCmec III sejam relacionados a presença deste clone pandêmico de MRSA coexistindo em nossa instituição (dados não demonstrados).

A hipótese da transferência do SCCmec entre *S. epidermidis* e *S. aureus* é fundamentada por várias evidencias. Hansen e colaboradores (2004) encontraram MRSA geneticamente únicos contendo variantes dos genes de *ccrAB* idênticos aos encontrados nos SCoN metilina resistentes, mas diferentes dos MRSA isolados em outras regiões. Parece não haver duvida de que os *S. aureus* e os SCoN têm o mesmo *pool* de genes contendo genes de resistência e recombinases, mas ainda é necessário definir os mecanismos e rotas de transferência da resistência entre os estafilococos (Hansen *et al.*, 2004).

Os sequenciamentos dos lócus amplificados para identificar os SCC*mec* tipos I, II, III e IV tiveram 100% de homologia. As diferenças foram em apenas nucleotídeos pontuais em uma das duas fitas. Os amplificados foram comparados com as seqüências do *GenBank* com números de acesso AB033763 para SCC*mec* tipo I, D86934 para o SCC*mec* tipo II, AB037671 para o SCC*mec* tipo III e AB033763 para o SCC*mec* tipo IV. Estes isolados foram usados como controles positivos nas reações de PCR. Dois isolados que amplificaram o SCC*mec* tipo III e o lócus D foram escolhidos para sequenciamento. O lócus D teve 100% de homologia com a seqüência AB063173 do *GenBank*, por outro lado, o SCC*mec* tipo III teve 96% de homologia com a seqüência AB037671 do *GenBank* (Oliveira *et al.*, 2002)

Foi feita uma análise descritiva da suscetibilidade aos antibióticos não β -lactâmicos dos SCoN entre os tipos de SCC*mec* (Tabela 2). De acordo com a literatura os isolados contendo SCC*mec* tipo III apresentam um número maior de genes de resistência (Ito *et al.*, 1999, Ito *et al.*, 2001). Neste estudo nós também encontramos que os isolados com o SCC*mec* tipo III são mais resistentes aos antibióticos não β -lactâmicos, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa para a maioria dos antibióticos (eritromicina $p = 0,171$, doxacilina $p = 0,982$, sulfametoxazol $p = 0,115$, gentamicina $p = 0,860$, cloranfenicol $p = 0,358$), com exceção da rifampicina, (rifampicina $p = 0,010$), levofloxacina (levofloxacina $p=0,005$) e clindamicina (clindamicina $p = 0,012$).

OS SCoN são reservatórios de genes de resistência e provavelmente são capazes de transmitir estes genes para os *S. aureus*. A semelhança dos SCC*mec*

entre os *S. aureus* e os SCoN sugere a transmissão horizontal entre as espécies de estafilococos. Além disto, o extensivo rearranjo observado nos complexos *ccr* e *mec* indicam uma troca freqüente de material genético (Hanssen *et al.*, 2006).

O *SCCmec* tipo IV foi identificado em *S. epidermidis* na década de 70 e somente cerca de dez anos depois foi descrito nos *S. aureus* (Wisplinghoff *et al.*, 2003). Considerando-se que o clone epidêmico brasileiro MRSA encontra-se disseminado geograficamente e contém o *SCCmec* tipo III este tipo de resistência pode ter como origem os SCoN (Da Silva *et al.*, 2000).

O aspecto mais relevante é que o *SCCmec* tipo III codifica um grande número de genes de resistência e esta informação é epidemiologicamente importante para o controle de infecção institucional. Tradicionalmente, os SCoN eram reconhecidos como bactérias de pouca importância clínica. Entretanto, com o conhecimento que se tem atualmente, sabe-se que eles podem ser o fator determinante que comanda a geração de novas cepas de MRSA.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos at Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

Aires de Sousa, M., de Lencastre, H. (2003). Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J Clin Microbiol* **41**, 3806-15.

- Archer, G. L., Niemeyer, D. M., Thanassi, J. A., Pucci, M. J. (1994).** Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 447-454.
- Budimir, A., Deurenberg, R. H., Plecko, V., Vink, C., Kalenic, S., Stobberingh, E. E. (2006).** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. *J Antimicrob Chemother* **57**,331-334.
- Caierao, J., Superti, S., Dias, C. A., d'Azevedo, P. A. (2006).** Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 277-80.
- Chambers, H. F. (1988).** Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **1**, 173-86.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X. X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J. H., Hiramatsu, K. (2006).** 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* **50**, 1001-1012.
- Chung, M., Dickinson, G., De Lencastre, H., Tomasz, A. (2004).** International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol* **42**, 542-7.
- Da Silva Coimbra MV, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, Vay C, Klan L, Figueiredo AM. (2000).** Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol*. Feb; 49(2):187-92.

Deurenberg, R. H., Vink, C., Oudhuis, G. J., Mooij, J. E., Driessen, C., Coppens, G., Craeghs, J., De Brauer, E., Lemmen, S., Wagenvoort, H., Friedrich, A. W., Scheres, J., Stobberingh, E. E. (2005). Different clonal complexes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine region. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4263-71.

Favre, B., Hugonnet, S., Correa, L., Sax, H., Rohner, P., Pittet, D. (2005) Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**, 697-702.

Hanssen, A. M., Ericson Sollid, J. U. (2006). SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**, 8-20.

Hanssen, A. M., Kjeldsen, G., Sollid, J. U. (2004). Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 285-96.

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

Hiramatsu, K., Watanabe, S., Takeuchi, F., Ito, T., Baba, T. (2004). Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **6**, S5-8.

Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1323-36.

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

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

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

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

Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1955-1963.

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 264-74.

Krediet, T. G., Jones, M. E., Janssen, K., Gerards, L. J., Fleer A. (2001). Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative

Staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* **39**, 3376-3378.

Krediet, T. G., Mascini, E. M., van Rooij, E., Vlooswijk, J., Paauw, A., Gerards, L. J., Fleer, A. (2004). Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* **42**, 992-995.

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

Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G. (1996). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **34**, 2888-2893.

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

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

Qi, W., Ender, M., O'Brien, F., Imhof, A., Ruef, C., McCallum, N., Berger-Bachi, B. (2005). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV *SCCmec* and a new *SCCmec* element associated with isolates from intravenous drug users. *J Clin Microbiol* **43**, 5164-5170.

Robinson, D. A. & Enright, M. C. (2003). Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3926-3934.

Shore, A., Rossney, A. S., Keane, C. T., Enright, M.C, Coleman, D. C. (2005). Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2070-2083.

Silva, G. D., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, R. C., Wilkinson, A. R., Day, N. P., Peacock, S. J. (2002) .The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**, 382-8.

Swenson, J, M., Tenover, F, C; Cefoxitin Disk Study Group. (2005). Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* **43**, 3818-3823.

Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G., Gala. J. L. (1995). Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **33**, 2864-2867.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., Edmond M. B.(2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**, 309-317.

Wisplinghoff, H., Rosato, A. E., Enright, M. C., Noto, M., Craig, W., Archer, G. L. (2003). Related clones containing *SCCmec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3574-3579.

York, M. K., Gibbs, L., Chehab, F., Brooks, G. F. (1996). Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **34**, 249-253.

Zhang, K., McClure, J. A., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J. M. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**, 5026-5033.

Tabela 1: Distribuição dos elementos SCCmec entre *Staphylococcus* spp coagulase negativa

SCCmec tipo	Total (%)	Nº (%) de cepas <i>Staphylococcus</i> spp coagulase negativa resistentes a meticilina (n= 129)					NI ^b
		<i>S.epidermidis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.capitis</i>	<i>S.sciuri</i>	
I	36 (28)	25 (19,4)	0	10 (7,8)	1 (0,8)	0	0
II	4 (3)	0	0	4 (3,1)	0	0	0
III	37 (29)	24 (18,6)	3 (2,3)	0	9 (7)	1 (0,8)	0
IV	1 (0,8)	1 (0,8)	0	0	0	0	0
I e III	4 (3)	4 (3,1)	0	0	0	0	0
III e IV	30 (23)	30 (23,2)	0	0	0	0	0
NT ^a	17 (13)	3 (2,3)	10 (7,8)	1 (0,8)	2 (1,5)	0 (0)	1 (0,8)

^aNT não tipáveis, ^bNI não identificado

Tabela 2: Padrão da distribuição da resistência dos antibióticos não beta lactâmicos entre 129 cepas de SCoN resistentes a meticilina e seus correspondentes SCCmec

SCCmec tipo	Total	Nº(%) de resistência entre <i>Staphylococcus spp</i> resistente a meticilina ^b								
		CLIN ^{††}	CLOR	DOXA	ERITRO	GENTA	LEVO ^{††}	RIFA ^{††}	SULFA	VANCO
I	36	24(66,6)	18(50)	12(33,3)	28(71,4)	33(91,7)	14(38,9)	10(27,8)	24(66,6)	0
II	4	1(25)	0	0	1(25)	2(50)	1(25)	0	1(25)	0
III	37	48(73,8)	25(39,1)	8(12,5)	49(75,4)	58(89,2)	43(70,5)	21(32,3)	51(78,5)	0
IV	1	1(100)	0	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0
NT ^a	17	6(37,5)	5(31,3)	5(31,3)	10(62,5)	13(81,3)	5(37,5)	3(18,8)	13(81,3)	0

^aNT Não tipável

^b CLIN, clindamicina; CLOR, DOXI, doxaciiclina; cloranfenicol; ERITRO, eritromicina; GENTA, gentamicina; LEVO, levofloxacino; RIFA, rifampicina; SULFA, sulfametoxazol; VANCO, vancomicina

^{††} A diferença da resistência aos antibióticos não β-lactâmicos entre os SCoN que tem o SCCmec III versus os SCoN que tem o SCCmec I, II e IV não foi estatisticamente significativa, exceto para a rifampicina (p= 0,01), levofloxacina (p= 0,005) e clindamicina (p= 0,012).



Figure 1: Multiplex PCR para os tipos de SCCmec de SCoN. Linha 1: marcador de peso molecular (100pb); linhas 2 e 3: isolado número 173 (*S. epidermidis*) com o SCCmec IV (342 pb); linhas 4 e 5: isolado número 110 (*S. capitis*) com SCCmec III (243 pb); linhas 6 e 7: isolado número 109 (*S. haemolyticus*) com o SCCmec II (342 and 284 pb); linhas 8 e 9: isolado número 111 (*S. epidermidis*) com o SCCmec I (342 and 495 pb).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho demonstram que os SCoN do Hospital de Clínicas tem uma prevalência de 71,36% de resistência à meticilina. Entre todos os SCoN o *SCCmec* tipo III é o mais comum, foi encontrado em 52% das cepas resistentes. O *SCCmec* tipo III apresenta o maior número de genes de resistência associado, portanto estas cepas de SCoN podem tornar-se o tipo mais virulento. SCoN com este tipo de *SCCmec* foram encontrados distribuídos em várias unidades (11N, 3L, 10N, 13N, com maior número de isolados e 1N, 3S, 4N, 4S, 6N, 7N, 8N, 9N, com menor número de isolados) deste hospital. Porém, 52% destas cepas encontram-se na UTI neonatal. Entre todas as cepas resistentes 51% apresentaram multiresistência (resistentes a cinco ou mais antimicrobianos).

Entre os SCoN que foram identificados com o *SCCmec* tipo III, 30 isolados continham uma região gênica adicional (*dcs*) que não é característica deste tipo, porém já descrita em outros estudos. Os 30 isolados foram identificados como *S. epidermidis*, podemos supor uma relação clonal entre eles, porém outras técnicas moleculares podem ainda ser aplicadas para elucidar esta relação epidemiológica. Pode-se também pesquisar nestes isolados a *ccrAB3* para confirmar o tipo de cassete. Outro fato a se considerar é que o clone endêmico de MRSA Brasileiro apresenta o *SCCmec* tipo III o mesmo encontrado prevalentemente entre nos SCoN. Muitas evidências levam a crer que ocorre a transmissão do *SCCmec* dos SCoN para os *S. aureus*. A detecção dos tipos de *SCCmec* nos *S. aureus* desta instituição pode ser pesquisada e seria de grande valor epidemiológico.

Estes dados tornam o reconhecimento laboratorial da resistência dos SCoN à metilina, como marcador da resistência aos β -lactâmicos, e suas implicações clínicas, cada vez mais relevante. O conhecimento da prevalência do gene *mecA* entre os *Staphylococcus* spp coagulase negativa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pode fornecer a probabilidade associada e a melhor conduta assistencial institucional e a terapêutica para os pacientes infectados com esta bactéria, além de políticas de controle de infecção e erradicação da bactéria nas principais unidades da instituição.