

CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA, ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS, POR MEIO DE TÉCNICAS FENOTÍPICAS E ANÁLISE DE PERFIL PLASMIDIAL

CHARACTERIZATION OF METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* BY PHENOTYPIC METHODS AND PLASMID PROFILE ANALYSIS

Mariko Ueno

Departamento de Medicina da Universidade de Taubaté

Antonio Olavo Cardoso Jorge

Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP

RESUMO

Pacientes hospitalizados estão normalmente sob risco de infecção. Além disso, o ambiente hospitalar favorece a aquisição de resistência aos agentes antimicrobianos pelas bactérias. A prevenção de infecções nosocomiais, baseada no sistema de vigilância como controle de infecção, é o único caminho para reduzir a morbidade e a mortalidade. As infecções nosocomiais causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina necessitam de pronto reconhecimento da cadeia de infecção, assim como rápida investigação e exclusão da fonte de infecção. Tradicionalmente, uma vez que os isolados de um surto tenham sido identificados como sendo da mesma espécie, posterior avaliação para similaridade ou proximidade tem sido baseada em métodos fenotípicos. Determinações de biotipagem, sorotipagem, fagotipagem e antibiotipagem não são adequadamente sensíveis para distinguir linhagens não relacionadas com fenótipos similares. Nos anos recentes, métodos moleculares, incluindo perfil plasmidial, têm sido úteis na avaliação de infecções endêmicas e de surtos de uma grande variedade de patógenos.

PALAVRAS-CHAVE: infecção nosocomial, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, caracterização fenotípica, plasmídeos

INTRODUÇÃO

Os microrganismos que causam infecção nosocomial têm mudado com o passar dos anos, por causa da pressão seletiva do uso e abuso dos antibióticos. Fatores de risco para a aquisição de organismos resistentes incluem hospitalização prolongada e tratamento prévio com antibióticos.

A resistência do *Staphylococcus aureus* às isoxazolilpenicilinas é cruzada com a metilina e a nafcilina, sendo tais microrganismos conhecidos como metilina-resistentes (MRSA).

O sistema ideal para identificação de cepas envolvidas em surtos precisa ser padronizado, reproduzível, sensível, prontamente disponível. Deve ter baixo custo e ser aplicável a uma grande variedade de microrganismos. Embora um sistema perfeito não exista ainda disponível, vários métodos são utilizados na identificação de cepas epidêmicas. Há duas principais vias de identificação, que utilizam características fenotípicas ou métodos moleculares.

Técnicas fenotípicas clássicas incluem biotipagem, antibiogramas, sorotipagem, tipagem de bacteriocinas e uso de bacteriófagos.

Métodos moleculares têm substituído os métodos fenotípicos como forma de confirmar a proximidade entre cepas envolvidas em um surto. A análise plasmidial tem sido utilizada para explicar a ocorrência de padrões de resistência não usual ou múltipla. O perfil plasmidial, padrão criado quando plasmídios são separados, com base no peso molecular, por eletroforese em gel de agarose, também pode ser utilizado para caracterizar a similaridade das cepas bacterianas. DNA plasmidial ou cromossomal também pode ser analisado pelo padrão de digestão de endonuclease de restrição.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) emergiu como um patógeno nosocomial no início da década de 60 (BARBER, 1961; KALLINGS, 1962; LANE, 1962).

Há basicamente dois mecanismos responsáveis pela resistência de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos que possuem anel b-lactâmico. Um mecanismo é a produção de b-lactamases, que são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à penicilina e que levaram ao desenvolvimento de penicilinas anti-estafilocócicas, resistentes às b-lactamases, como a meticilina; outro mecanismo é uma alteração nas proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs); além disso, a resistência pode ser devida a alterações na permeabilidade, impedindo o antibiótico de atingir o seu receptor. Todas as MRSA produzem uma PBP (PBP2a ou 2') (UTSUI; YAKOTA, 1985; TOMASZ, NACHMAN; LEAF, 1991). Resistência intrínseca à meticilina devida à PBP2a está ligada à presença de um gene cromossomal na região mec, o qual é regulado por outros genes, incluindo o gene repressor mecR (HACKBARTH; CHAMBERS, 1989a; MURAKAMI; TOMASZ, 1989).

A resistência à meticilina em estafilococos é explicada por alguma variação nas proteínas ligadoras de penicilina, na maioria dos casos; entretanto, é causada pela aquisição do gene mecA, que é transmitida lateralmente entre as diferentes espécies de estafilococos (HIRAMATSU, 1992).

Todas as cepas de MRSA isoladas de amostras clínicas contêm o gene mecA, uma sequência de 2130 pb do DNA de origem não estafilocócica é incorporado ao seu cromossomo. O gene mecA codifica para uma proteína ligadora de penicilina (PBP 2a), que tem baixa afinidade para os antibióticos b-lactâmicos. O gene mecA e seu produto gênico não são exclusivos no controle do fenótipo de resistência, uma vez que as cepas isoladas, independente de sua concentração inibitória mínima, contêm quantidades comparáveis de PBP 2a, sugerindo que outros fatores, alheios ao produto gênico do mecA, exercem um papel essencial na expressão fenotípica da resistência (LENCASTRE et al., 1994).

Cepas de *S. aureus* com menor susceptibilidade à meticilina por causa da alta produção de b-lactamase são chamados de BORSA para "borderline oxacillin-resistant *S. aureus*" (MCDOUGAL; THORNSBERRY, 1986). Esta resistência assim chamada *borderline* parece ser diferente da resistência intrínseca de MRSA; porém, no laboratório é difícil distinguir entre ambas (MULLIGAN; CITRON; KWOK, 1987). Algumas linhagens de BORSA não contêm PBP2a, apresentando, portanto, outro mecanismo de resistência (MURAKAMI; TOMASZ, 1989). Nos estudos de Gerberding et al. (1991) apenas dois dos seis Borsa isolados possuíam PBP2a. Embora diferentes mecanismos de resistência possam interagir, a resistência *borderline* é considerada primeiramente mediada por plasmídeo (diferente da resistência mediada por cromossoma, como no caso de MRSA).

Métodos culturais para seleção de MRSA

Para o levantamento de portadores de MRSA, as amostras podem ser plaqueadas diretamente em meios seletivos (REBOLI et al, 1990).

Apesar de todas as células bacterianas de MRSA, em cultura pura, terem a mesma habilidade genética de expressar sua resistência aos antibióticos b-lactâmicos, algumas células podem se comportar de maneira diferente (SABATH, 1982; JORGENSEN, 1986). Frequentemente, apenas 1 célula em 10^4 a 10^8 demonstra rápida resistência (HACKBARTH; CHAMBERS, 1989b). Este fenômeno, chamado de hetero-resistência, demonstra a necessidade de métodos especiais para a detecção de MRSA. Temperatura de incubação mais baixa e aumento da concentração de sal aumentam a expressão da resistência (JORGENSEN et al., 1988). Os métodos de difusão em disco, macrodiluição e microdiluição são adequados para detectar linhagens de MRSA, se forem seguidos de métodos padrões (THORNSBERRY; MCDOUGAL, 1983; HANSE; WALSH, 1987; PFALLER et al., 1988).

O Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (NCCLS) recomenda o método de microdiluição (NCCLS, 1990). A oxacilina é preferida porque é mais estável durante o armazenamento. A meticilina pode ser usada, apesar de algumas linhagens serem susceptíveis à meticilina, mas resistentes à oxacilina. A resistência é definida como a concentração inibitória mínima (MIC) de oxacilina maior ou igual a 4 mg/mL ou a MIC de meticilina maior ou igual a 8 mg/mL. Borsa normalmente tem MIC de oxacilina de 1 a 2 mg/mL ou MIC de meticilina de 2 a 4 mg/mL (MCDOUGAL; THORNSBERRY, 1986; MULLIGAN; CITRON; KWOK, 1987; GERBERDING et al., 1991).

A difusão em disco também é um método confiável para a detecção de MRSA (NCCLS, 1990; JOLLY; GOLDBERG, 1989). É utilizado disco com 1 mg de oxacilina, com o inóculo preparado como descrito acima e incubação por 24 horas a 35°C. Discos contendo inibidores de b-lactamase também podem ser úteis na diferenciação de MRSA das outras linhagens de *S. aureus* incluindo Borsa (MCDOUGAL; THORNSBERRY, 1986).

Ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de cloreto de sódio, contendo 6 mg/mL de oxacilina pode ser adotado para o “screening” (THORNSBERRY; MCDOUGAL, 1983; MCDOUGAL; THORNSBERRY, 1986; JORGENSEN et al., 1988). Testes de sensibilidade automatizados têm sensibilidade variável para detecção de MRSA (HACKBARTH; CHAMBERS, 1989b), talvez por causa do tamanho do inóculo, temperatura de incubação ou duração da incubação não serem ideais. Provas de DNA para detectar o gene *mec* são úteis para a detecção de MRSA (ARCHER; PENNELLI, 1990; FLUIT; BOX; VERHOEF, 1990).

Caracterização fenotípica

A caracterização das cepas pode ser utilizada para identificar as fontes de MRSA, para avaliar o papel de portadores humanos e para diferenciar cepas epidêmicas das endêmicas. Os métodos atualmente utilizados são baseados em características fenotípicas dos microrganismos, embora novos métodos moleculares estudem diretamente o material genético (MULLIGAN; ARBEIT, 1991; KREISWIRTH; KORNBLUM; ARBEIT, 1993). Características fenotípicas como padrões de sensibilidade a drogas e susceptibilidade aos bacteriófagos têm sido amplamente estudadas, porém têm limitações específicas, como reprodutibilidade de resultados e dificuldade de discriminar espécies intimamente relacionadas.

Caracterização molecular

Técnicas moleculares, como *fingerprints* de DNA genômico e plasmidial, RFLP de fragmentos amplificados por PCR e RAPD, estão sendo utilizadas na diferenciação das cepas de MRSA (MARSHAL et al., 1998; KALTWASSER et al., 1995; KREISWIRTH; LUTWICK; CHAPNICK, 1995; FLUCKIGER; WOLZ; CHEUNG, 1998).

Análise de DNA plasmidial

Os plasmídios de uma célula normalmente perfazem menos de 5% do DNA total; a análise de perfil plasmidial requer primeiramente a sua separação do DNA cromossômico. Atualmente existem vários métodos de preparação rápida para extração de plasmídios em pequena escala, e podem ser utilizados com propósitos de identificação e estudos epidemiológicos de *Staphylococcus* (DUNCKLE; SIPPEL, 1984; NAHAIE; GOODFELLOW; HARWOOD, 1984).

A técnica de análise de DNA plasmidial usando endonuclease de restrição (REAP) é amplamente utilizada devido à alta reprodutibilidade e simplicidade (FANG et al., 1993) e maior poder discriminatório (HARTSTEIN et al., 1989; HARTSTEIN et al., 1995a). Através de REAP demonstrou-se que cepa de uma única linhagem espalhou-se pelos hospitais no Brasil (SADER et al., 1993).

Estudo utilizando a técnica de REAP em isolados de centro cirúrgico mostraram que, em casos de infecção nosocomial, os isolados não tinham relação com as linhagem encontradas nos funcionários do local (HARTSTEIN, 1995b). Por outro lado, RODRIGUES et al., (1993) mostraram que existe uma transmissão cruzada dos portadores nasais da equipe de saúde do centro de terapia intensiva aos paciente.

A análise plasmidial utilizando endonuclease de restrição foi amplamente empregada, em diferentes amostras de diferentes partes de hospital e 10 diferentes sub-tipos de MRSA foram encontrados (LIU et al., 1996; PFALLER et al., 1991).

Embora a análise de plasmídios tenha sido útil para a avaliação de surtos de MRSA (ARCHER; MAYHALL, 1983; KOZARSKY et al., 1986; RHINEART et al., 1986; HARTSTEIN et al., 1989), algumas cepas possuem plasmídios de 20 a 32 Md que têm pequeno poder discriminatório (COHEN; WONG; FALKOW, 1982).

DISCUSSÃO

As moléculas mais fáceis de analisar são os plasmídios. Após a publicação de um método simples e rápido de extração de plasmídios por Birnboim, Doly (1979), seguiram numerosos métodos derivativos com modificações para cada gênero; entretanto, a pequena estabilidade dos plasmídios em algumas cepas pode ser a maior desvantagem.

A caracterização pela endonuclease de restrição, REAP, tem um alto poder discriminatório na identificação de subtipos dentro de cepas isoladas em hospital, e é útil para direcionar o controle da infecção dentro do hospital (PFALLER, 1991); entretanto, é discutível utilizar somente a análise de plasmídios com fins epidemiológicos, já que são moléculas que podem ser perdidas com facilidade. Portanto, o método é de grande valor quando utilizado em conjunto com outra técnica molecular ou mesmo técnicas de cultivo, para refutar a presença de um clone.

Não é sempre verdadeiro que perfil plasmidial idêntico seja indicativo de uma relação epidemiológica, já que é possível que organismos relacionados evolutivamente tenham adquirido uma coleção básica de plasmídios. Importantes considerações incluem o fato de que divergências de *fingerprints* plasmidiais podem ocorrer rapidamente na ausência de pressão seletiva; por outro lado, plasmídios sorologicamente associados são extremamente estáveis e não podem ser usados para identificação em base epidemiológica. Guardadas as devidas limitações, análises de plasmídios podem ser aplicadas para investigação e identificação de diferentes microrganismos.

Análises de perfil plasmidial é mais efetiva quando as cepas contêm múltiplos plasmídios. É importante ressaltar que, embora muitas cepas possuam múltiplos plasmídios no momento da extração, alguns desses podem ser perdidos durante estocagem prolongada. Além disso, alguns problemas de interpretação podem advir da presença de diferentes formas de um plasmídio, fornecendo três bandas. Problemas podem ocorrer quando as preparações têm plasmídios grandes, porque eletroforese em gel de agarose não é um método muito sensível para detecção de pequenas diferenças entre plasmídios de tamanho similar. Tais problemas podem ser minimizados, com utilização de endonucleases de restrição para gerar *fingerprints* de plasmídios.

A especificidade da clivagem do DNA por endonucleases de restrição significa que a digestão completa de uma seqüência de DNA por uma enzima específica ou combinação de enzimas resulta na produção em fragmentos lineares, gerados segundo a frequência e localização das seqüências de reconhecimento enzimático. Portanto, moléculas de DNA plasmidial podem ser comparadas pela análise do número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão do DNA com endonucleases de restrição. O padrão dos fragmentos produzidos é chamado de *fingerprint* de plasmídio, e as variações observadas entre moléculas relacionadas são chamadas de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLPs).

Dependendo da molécula do DNA plasmidial a ser examinada, uma ou mais endonucleases de restrição são selecionadas com base em quantos fragmentos se deseja produzir. O número de fragmentos deve ser suficiente para fornecer boa discriminação, porém não deve ser excessivo, para que não haja sobreposição ou para que não sejam coincidentes no gel, dificultando a interpretação.

Grimont e Grimont (1991) sugeriram que uma mistura ideal de fragmentos conforme padrão conhecido para a determinação de tamanho, deve consistir de pelo menos dez fragmentos, incluindo fragmentos que sejam maiores e menores que os fragmentos gerados do DNA plasmidial em teste, com a ressalva de que fragmentos maiores que 20kb não migram adequadamente em gel de agarose.

A geração de *fingerprints* plasmidial é de maior valor para finalidades epidemiológicas quando apenas plasmídios aparentemente similares de tamanhos relativamente grandes podem ser identificados, ou quando perfis plasmidiais similares ocorrem em cepas que não podem ser diferenciadas por outros métodos.

Os plasmídios diferem consideravelmente em número de sítios de restrição para uma determinada enzima, e um grande número de diferentes enzimas tem sido usado para gerar os *fingerprints*. Um engano que ocasionalmente pode ocorrer está relacionado ao preciso significado epidemiológico ou taxonômico de *fingerprints* de dois plasmídios que diferem em apenas um ou dois fragmentos. É importante considerar que RFLPs podem ser gerados por uma simples troca de um par de base na estrutura do DNA. Essa troca pode ocorrer espontaneamente a qualquer tempo, mesmo durante o crescimento de uma cultura para a preparação do DNA plasmidial. Microrganismos que geram *fingerprints* plasmidiais totalmente diferentes certamente têm plasmídios diferentes, e devem, portanto, ser epidemiologicamente distintos. Cepas que geram *fingerprints* que diferem em apenas um ou mais fragmentos de DNA devem ser considerados como tendo uma íntima relação, até que dados suplementares por outras técnicas de caracterização sejam disponíveis.

Análise plasmidial, particularmente quando suplementada com digestão por endonucleases, tem sido uma ferramenta importante para demonstrar que os microrganismos envolvidos em surtos hospitalares pertencem a um mesmo clone (WACHSMUTH, 1986). Entretanto, a análise de plasmídios não discrimina perfeitamente como elementos genéticos móveis podem ser perdidos ou transferidos entre microrganismos (MCDONNELL; SWEENEY; COHEN, 1983; SCHABERG; ZERVOS, 1986; MULLIGAN; ARBEIT, 1991). Plasmídios freqüentemente sofrem rearranjos, o que pode levar a erros de interpretação dos fragmentos. Além disso, muitos patógenos nosocomiais contêm poucos ou não possuem plasmídios, o que faz com que o método não seja adequado para a sua caracterização (PFALLER, 1991).

Embora a análise de perfil plasmidial e *fingerprints* plasmidial possam ser técnicas extremamente úteis para identificação e caracterização, nem todas as cepas possuem plasmídios. Além disso, os plasmídios podem sofrer rearranjos, ou podem ser adquiridos ou perdidos. Tais problemas podem ser solucionados pelo exame do DNA cromossomal.

CONCLUSÃO

O diagnóstico gênico tem sido introduzido nos laboratórios clínicos e a técnica tem tido um papel indispensável na medicina clínica. Tanto patógenos endógenos como exógenos têm sido alvo de diagnóstico através dos genes. A utilização de PCR tem ampliado de maneira marcante a aplicação de diagnóstico por meio da análise de um ou mais genes ou do genoma inteiro.

Os testes comumente utilizados para diagnóstico de MRSA é o cultivo da bactéria em meio apropriado e subsequente *screening* com disco de oxacilina. Entretanto, o uso de técnicas moleculares é considerado mais rápido e sensível. Os perfis plasmidiais podem ser úteis na complementação de técnicas culturais já existentes.

Nas ciências médicas, ambas as estratégias, análise da variabilidade do gene e do genoma por meio de técnicas moleculares, têm um impacto crescente no estudo da disseminação de microrganismos, especialmente aqueles que são resistentes múltiplos aos antibióticos. Estudos epidemiológicos necessitam de vários métodos moleculares, e a caracterização pela endonuclease de restrição, REAP, tem alto poder discriminatório na identificação de subtipos dentro de cepas isoladas em hospital, para melhor delinear a fonte e a propagação de cepas de MRSA.

ABSTRACT

Hospitalized patients are usually under high risk of infections, and furthermore, the hospital environment favours the acquisition of resistance to antimicrobial agents, complicating the treatment of nosocomial infections due to drug-resistant pathogens. The prevention of nosocomial infections, based on a surveillance system as an essential element of an infection control program, is the only way to reduce morbidity and mortality. Nosocomial infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necessitate the prompt recognition of the infectious chain, as well as, a rapid investigation and exclusion of infectious sources. Traditionally, once that bacterial isolation from an outbreak has been identified, as being of the same species, a further evaluation for similarity

or proximity has been based on phenotypic methods. Biotyping, serotyping, phagotyping and antibiotype decisions are not always adequately sensitive to distinguish unrelated strains with similar phenotypes. In recent years, molecular genetic methods, including plasmid profile have been useful in evaluating endemic infections and outbreaks of great variety of nosocomial pathogens.

KEY-WORDS: nosocomial infection, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, phenotypic characterization, plasmids

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHER, G. L.; MAYHALL, C. G. Comparison of epidemiological markers used in the investigation of outbreak of methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* infections. *J. Clin. Microbiol.*, v. 18, p. 295-318, 1983.

ARCHER, G. L.; PENNELI, E. Detection of methicillin resistance in staphylococci using a DNA probe. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, p. 1720-1724, 1990.

BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, v. 14, p. 385-393, 1961.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

COHEN, M. L.; WONG, E. S.; FALKOW, S. Common plasmids in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* during nosocomial *Staphylococcus aureus* outbreaks. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 21, p. 210-215, 1982

DUNKLE, L. M.; SIPPEL, C. J. Rapid microprocedure for extraction of plasmid from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, v. 149, p. 921-923, 1984.

FANG, F. C. et al. Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. *JAMA*, v. 270, p. 1323-1328, 1993.

FLUCKIGER, U. WOLZ, C.; CHEUNG, A. L. Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 2871-2878, 1998.

FLUIT, A. C.; BOX, A. T. A.; VERHOEF, J. A probe for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 8, p. 605-608, 1990.

GERBERDING, J. L. et al. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2^a in borderline oxacillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 2574-2579, 1991.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. rRNA probes as tools for molecular epidemiology of microbial infections. In: *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*, (eds. A. Vaheri, R. Tilton e A. Balows), Springer-Verlag, Berlin, p. 47-53, 1991.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, p. 991-994, 1989.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, p. 995-999, 1989.

- HANSEN, S. L.; WALSH, T. J. Detection of intrinsically resistant (heteroresistant) *Staphylococcus aureus* with the acceptor and auto micro systems. *J. Clin. Microbiol.*, v. 25, p. 412-415, 1987.
- HARTSTEIN A. I. et al. Restriction enzymes analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *Staphylococcus aureus* blood culture isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 1874-1879, 1989.
- HARTSTEIN, A. I. et al. *In vivo* stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing by restriction endonuclease analysis of plasmid DNA compared with those of other molecular methods. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 2022-2026, 1995.
- HARTSTEIN, A. I. et al. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital and an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 16, p. 405-411, 1995.
- HIRAMATSU, K. Molecular genetics of MRSA. *Nippon Rinsho*, v. 5, p. 938-944, 1992 (abstract).
- JOLLY, J.; GOLDBERG, M. Methicillin resistance in staphylococci: an evaluation of conditions for detection. *Med. Lab. Sci.*, v. 46, p. 2-5, 1989.
- JORGENSEN, J. H. Laboratory and epidemiologic experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the USA. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, v. 5, p. 693-696, 1986.
- JORGENSEN, J. H. et al. Salt-supplemented medium for testing methicillin-resistant staphylococci with newer beta-lactams. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, p. 1675-1678, 1988.
- KALLINGS, L. O. The susceptibility of staphylococcal hospital strains to methyl-phenyl-isoxazolyl penicillin. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 54, p. 127-128, 1962.
- KALTWASSER, G. et al. Molecular study of 6 episodes of nosocomial infections produced by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev. Med. Chile.*, v. 122, p. 487-495, 1995.
- KOZARSKY, P. E. et al. Plasmid analysis of simultaneous nosocomial outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control*, v. 7, p. 577-581, 1986.
- KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R. D. et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science*, v. 259, p. 227-230, 1993.
- KREISWIRTH, B.; LUTWICK, S. M; CHAPNICK, E. K. et al. Tracing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Southern blot hybridization using gene-specific probes of *mec* and Tn554. *Microb. Health Res.*, v. 1, p. 307-313, 1995.
- LANE, W. R. Methicillin resistance in staphylococci. *Med. J. Aust.*, v. 49, p. 962-965, 1962.
- LENCASTRE, H. et al. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 33, p. 7-24, 1994.
- LIU, P. Y. et al. Use of restriction endonuclease analysis of plasmids and pulsed-field gel electrophoresis to investigate outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, p. 86-90, 1996.

- MARSHALL, S. S. et al. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 30, p. 205-214, 1998.
- McDONNELL, R. W.; SWEENEY, H. M.; COHEN, S. Conjugational transfer of gentamicin resistant plasmids intra-and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 23, p. 151-160, 1983.
- McDOUGAL, L. K.; THORNSBERRY, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.*, v. 23, p. 832-839, 1986.
- MULLIGAN, M. E.; CITRON, D. M.; KWOK, R. Y. Y. et al. Impact of prolonged incubation on disk diffusion susceptibility test for *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 25, p. 840-844, 1987.
- MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Epidemiologic utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 12, p. 20-28, 1991.
- MURAKAMI, K.; TOMASZ, A. A involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v. 171, p. 874-879, 1989.
- NAHAIE, M. R.; GOODFELLOW, M.; HARWOOD, C. R. A rapid screening procedure for staphylococcal plasmids. *J. Microbiol. Met.*, v. 2, p. 73-81, 1984.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Standard M2-A4. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990.
- PFALLER, M.A. et al. Evaluation of laboratory methods for the classification of oxacillin-resistant and oxacillin susceptible *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 89, p. 120-125, 1988.
- PFALLER, M. Typing methods for epidemiologic investigation . In: Ballows A. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; p. 171-182, 1991.
- MASSANARI, R. M. The clinical microbiology laboratory as an aid in infection control. The application of molecular techniques in epidemiologic studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 14, p. 209-217, 1991.
- REBOLI, A. C.; JOHN, J. F.; LEVKOFF, A. H. Epidemic methicillin-gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Am. J. Dis. Child*, v. 143, p. 35-39, 1989.
- RHINEART, E. et al. Nosocomial clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch. Intern. Med.*, v. 147, p. 521-524, 1986.
- RODRIGUES, J. N. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility testing. Testing of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 16, p. 9-16, 1993.
- SABATH, L. D. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.*, v. 97, p. 339-344, 1982.
- SADER, H. S. et al. Oxacillin and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 14, p. 260-264, 1993.

SCHABERG, D. R.; ZERVOS, M. Plasmid analysis in the study of the epidemiology of nosocomial Gram-positive cocci. *Rev. Infect. Dis.*, v. 8, p. 705-712, 1986.

THORNSBERRY, C.; McDOUGAL, L. K. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, v. 18, p. 1084-1091, 1983.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression methicillin-resistant clinical isolated of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 124-129, 1991.

UTSUI, Y; YAKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephen-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 28, p. 397-403, 1985.

WACHSMUTH, K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.*, v. 8, p. 682-692, 1986.