

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES DE ANÁLISE DE DNA CROMOSSOMAL DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA

MOLECULAR TECHNIQUES COMPARISON OF CROMOSSOMAL ANALYSIS OF METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus*

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

Desde a introdução dos antibióticos de uso clínico, as bactérias têm desenvolvido meios de proteção por meio de diferentes mecanismos de resistência. Atualmente é crescente a questão das bactérias multirresistentes em todo o mundo. Esses problemas são mais evidentes em hospitais, nos quais ocorrem surtos de infecção hospitalar. Nos dias atuais, a maior preocupação no campo da resistência bacteriana, em escala mundial, é *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O mecanismo básico da resistência é a alteração nas proteínas ligadoras de penicilina. Métodos de isolamento de MRSA por meio de técnicas moleculares estão aqui revisadas.

PALAVRAS-CHAVE: infecção nosocomial; *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; caracterização molecular

INTRODUÇÃO

A importância das infecções adquiridas nos hospitais está bem estabelecida. Elas ocorrem a uma taxa de 5 a 10 por cem admissões nos Estados Unidos, representando uma importante causa de morte e resultando em acréscimo significativo ao custo das doenças de base.

Importante é a resistência que vem sendo observada em *Staphylococcus aureus* à meticilina que é cruzada com oxacilina, sendo tais microrganismos conhecidos como meticilina-resistentes (MRSA) ou oxacilina-resistentes (ORSA).

Métodos moleculares têm substituído os métodos fenotípicos como forma de confirmar a proximidade entre cepas envolvidas em um surto. DNA plasmidial ou cromossomal também pode ser analisado através de padrão de digestão de endonuclease de restrição. Enzimas de restrição reconhecem seqüências específicas de nucleotídeos no DNA e produzem quebras na dupla fita produzindo pequenos fragmentos. Os fragmentos de vários tamanhos são separados utilizando eletroforese em gel baseado no peso molecular.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) emergiu como um patógeno nosocomial no início da década de 60 (Coolley; McNICOL; BRACKEN, 1965; Kallings, 1962; Lane, 1962).

Técnicas moleculares como *fingerprints* de DNA genômico e plasmidial, RFLP de fragmentos amplificados por PCR e RAPD estão sendo utilizados na diferenciação das cepas de MRSA (Nawas et al., 1998; Kreiswirth et al., 1995).

Polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)

Análise do genoma de microrganismos cortado com enzima de restrição (RFLP) é uma ferramenta potencial como método de identificação (Prevost; Jaulhac; Piemont, 1992; Lina et al., 1992).

Uma técnica de caracterização de *S. aureus* utiliza o polimorfismo do gene coagulase (coa) como um marcador epidemiológico (Lawrence et al., 1996). Este método é realizado com *primers*, homólogos à região conservada do gene coa, no intuito de amplificar as sequências que codificam a região C-terminal desta molécula (Schwarzkopf; Karch, 1994; Kobayashi et al., 1995; Hookey; richardson; cookson, 1998; Goh et al., 1992; Nada et al., 1996).

A análise de MRSA através de RFLP pela digestão com endonuclease SmaI e resolução dos fragmentos em gel de eletroforese de campo pulsado (PFGE) (el-Adhami et al., 1991) estima a similaridade entre as cepas e demonstra que as mesmas podem ser divididas em dois grupos: RFLP tipo I e II. Estudos epidemiológicos demonstraram que RFLP tipo I era mais comumente encontrado em unidade de terapia intensiva, enquanto que RFLP tipo II estava mais distribuído. Os estudos de Carles-Nurit et al. (1992) suportam a hipótese de que todas as cepas de MRSA surgiram de um único clone e enfatizam a necessidade da utilização de vários métodos em conjunto nas investigações de surtos de MRSA.

Em um investigação filogenética de 16 anos Givney et al. (1998) estudaram a população de MRSA utilizando a endonuclease SmaI, desenvolveram diferentes padrões de RFLP. O estudo sugeriu o aparecimento de um novo clone de MRSA, entretanto as cepas guardavam o mesmo padrão de fagotipagem.

Digestão com a enzima SmaI e posterior separação dos fragmentos por PFGE revelaram seis diferentes padrões de RFLP em cepas isoladas de diferentes hospitais do Brasil. Cepas com idêntico padrão foram encontradas em oito dos nove hospitais investigados, demonstrando ampla disseminação de um mesmo clone de MRSA (Sader et al., 1993).

Técnicas de amplificação

Através da amplificação de determinados genes e subsequente análise genética dos fragmentos, podem ser obtidas informações da filogenia e da sistemática microbiana, de uma maneira rápida e eficiente (van Belkum et al., 1998).

Amplificação da região hipervariável do gene mec mostrou ser útil no estabelecimento da origem de infecção nosocomial (Nishi et al., 1995; Schmitz et al., 1998) por MRSA.

A técnica de PCR foi utilizada para a ampliação simultânea dos genes: *mecA*, *femA*, e o gene da termonuclease extracelular e PBP2', *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e estafilococos coagulase-negativos também foram testados e o ensaio apresentou ser específico para MRSA (Cotter et al., 1997).

Através de estudos realizados com o gene coagulase, pode-se avaliar atualmente que os MRSA isolados de ambiente hospitalar são geneticamente relacionados, uma vez que apresentam o mesmo padrão de hibridização, por outro lado, cepas isoladas da comunidade e MSSA apresentam-se relacionadas, porém com padrão diferente daquele de MRSA hospitalar e este estudo mostra que a análise de hibridização utilizando um único gene como sonda é menos discriminatório que a análise de RFLP do genoma total (el-Adhami; Stewart, 1997).

Análise de RAPD, também conhecido como PCR com primer arbitrário (AP-PCR), retira o requerimento de primers escolhidos sem o conhecimento do genoma (Welsh; McClelland, 1990; Willians et al., 1990) e a sua utilização tem fornecido alto nível de caracterização (Damiani et al., 1996; Saulnier et al., 1997; van Belkum et al., 1997b) e mostraram que a proteína A e o polimorfismo do gene coa não têm papel significativo na colonização (van Belkum et al., 1997a).

AP-PCR pode ser usada para um primeiro *screening* para verificação da proximidade entre linhagens de MRSA (van Belkum et al., 1995), as linhagens MRSA com coagulase tipo IV apresentavam sempre o mesmo padrão, sugerindo que são transmitidas nosocomialmente. Por outro lado, as linhagens com coagulase tipo II apresentaram diferentes padrões, sugerindo que não são transmitidos em infecção nosocomial. Estudos realizados com polimorfismos de fragmento de restrição do gene da coagulase utilizando AP-PCR mostrou que alguns pacientes poderiam estar infectados com duas cepas diferentes. (Todha; Maruyama; nara, 1997).

A combinação de PFGE com método baseado em PCR (amplificação da região espaçadora), polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD), PCR do gene da proteína A forneceram as melhores resoluções e levaram à identificação de subtipos de MRSA (Schmitz et al., 1998).

A caracterização de MRSA através de RAPD é mais simples, rápida e altamente eficaz na investigação epidemiológica, além disso a técnica consome um tempo menor do que a análise por PFGE (Tambic et al., 1997).

Técnicas de seqüenciamento

A polimórfica região-x do gene da proteína A (*spa*) demonstrou ser estável para caracterização epidemiológica MRSA (Frenay et al., 1994), embora seja uma ferramenta importante dentro e entre hospitais (Frenay et al., 1996), a análise do polimorfismo do gene da coagulase tem maior poder discriminatório (Kobayashi et al, 1995; Hoefnagels-Schuermans et al., 1997).

Desde a sua primeira descrição por Grimont e Grimont (1986), a ribotipagem tem emergido como o mais poderoso dos métodos disponíveis para investigação epidemiológica; está baseado em hibridização utilizando RNA ribossomal (rRNA) como sonda. Seqüências de rRNA contêm regiões conservadas que podem hibridizar com genes do rRNA de qualquer espécie.

As moléculas de rRNA são empregadas para determinar a inter-relação filogenética dos microrganismos (Woese, 1987). A grande maioria dos estudos filogenéticos tem-se centrado no rRNA 16S e existe um vasto conhecimento de seqüências comparativas da subunidade menor do rRNA, em contrapartida, pequeno número de seqüências da subunidade rRNA 23S é conhecido. Informações sobre o espaço intergênico rRNA 16S-23S e a distribuição dos genes de tRNA codificados nessa região são igualmente raras (Mendoza et al., 1998). A seqüência conservada da região espaçadora 16S-23S são indicadores diretos e estáveis da divergência evolucionária de cepas de *S. aureus* (Gürtler; Barrie, 1995).

Os genes do rRNA em bactérias são organizados em operons, dentro dos quais os genes que codificam para os RNA 16S, 23S e 5S são freqüentemente separados pela região espaçadora não codificante do DNA. A utilização de sonda, mistura de RNA 16S e 23S, resulta na hibridização apenas com fragmentos no *fingerprint* cromossomal que contêm partes dos genes correspondentes. Por outro lado, a utilização de sondas fragmentos clonados dos genes de rRNA pode resultar na hibridização com os genes correspondentes e a seqüência espaçadora. Então, padrões de hibridização diferentes podem ser obtidos, dependendo da sonda utilizada (Saunders et al., 1990).

A maioria das bactérias contém entre 2 a 11 cópias do gene rRNA por célula (Gottlieb; Rudner, 1985; Srivastava; Schlessinger, 1990). As regiões espaçadoras entre os genes rRNA 16S e 23S codificam vários tRNAs e têm várias seqüências repetitivas em regiões não codificantes do grupo de genes (Bacot; Reeves, 1991). Embora os genes do tRNA sejam altamente conservados, o comprimento dos espaçadores intergênicos dos tRNA variam consideravelmente.

A combinação de PFGE com a amplificação da região espaçadora fornece caracterização de cepas diante de uma infecção nosocomial por MRSA (Schmitz et al., 1998).

DISCUSSÃO

Sob o ponto de vista dos puristas, é preferível analisar o genótipo dos microrganismos uma vez que estas análises não recaem na expressão de genes particulares, e não estão, portanto, sujeitos às variações fenotípicas.

O cromossomo microbiano é uma molécula grande e frágil, o que requer técnicas especiais de extração para evitar quebras por forças mecânicas durante a extração. Uma maneira de solucionar o problema do tamanho do DNA cromossomal é a digestão com endonuclease de restrição para formar fragmentos capazes de serem separados por métodos padrões de eletroforese.

Para os propósitos de identificação, é normal se fazer uma simples comparação visual de padrão de bandas para ver se os *fingerprints* são similares ou diferentes.

A presença de DNA plasmidial ou bacteriófagos pode complicar a interpretação dos *fingerprints*. É, portanto, desejável primeiro analisar o DNA não digerido, por eletroforese em gel de agarose, para testar a presença de qualquer banda adicional ao DNA cromossomal.

Uma dificuldade adicional advém do fato de que técnicas de eletroforese convencionais não fornecerem boa resolução de fragmentos de DNA maiores de 50kb. As enzimas de restrição que cortam cromossomos bacterianos em fragmentos menores que 50 kb tendem a formar fragmentos de tamanhos similares que dificultam a separação e sua interpretação no gel de eletroforese. Para solucionar este problema desenvolveu-se a eletroforese de campo pulsado (PFGE) descrito primeiramente por Schwartz e Cantor (1984), moléculas de DNA maiores de 10 megabases são capazes de re-orientar e mover diferencialmente através dos poros do gel de agarose (Schwartz; Cantor, 1984; Chu; Vollrath; Davis, 1986).

Os métodos de eletroforese convencionais são baseados na habilidade de um gel separar moléculas, com base no tamanho, sob a influência de um campo elétrico unidirecional. Em contraste, PFGE utiliza sucessivos campos elétricos alternados que forçam as moléculas a mudarem continuamente a direção de migração. A separação é baseada, provavelmente no fato que as moléculas maiores mudam de direção mais lentamente que as menores. Entretanto, o mecanismo preciso da separação ainda não é totalmente conhecido, embora seja objeto de numerosos estudos (Slater; Noolandi, 1989; Stellwagen; Stellwagen, 1989; Viovy, 1989). Padrões de PFGE idênticos obtidos com uma enzima particular não necessariamente significam que duas cepas sejam idênticas. Diferenças são conclusivas, porém similaridades não o são.

Estudos indicam que padrões múltiplos de RFLP em MRSA não necessariamente representam clones múltiplos derivados de diferentes eventos de transferência do gene *mec* e sugerem a ocorrência de pequenos rearranjos no DNA cromossomal durante um surto, embora a PFGE utilizando a endonuclease de restrição *Sma*I seja uma ferramenta útil na avaliação da disseminação de um clone; diante de um surto, é recomendável a utilização de vários métodos para melhor delinear a fonte e a extensão do surto; o poder discriminatório e a reprodutibilidade do REAP o faz um adjunto útil nesse contexto. Tais variações dentro de um clone são significativos na interpretação de um perfil de RFLP durante um surto de infecção e enfatiza a necessidade de se utilizar dois métodos de caracterização das cepas MRSA.

Procedimentos de hibridização

Técnicas de hibridização utilizando sondas de ácidos nucléicos são utilizados para detecção de microrganismos específicos em uma variedade de amostras. A abordagem mais comum envolve o uso de sonda de um fragmento de DNA clonado ou um oligonucleotídeo sintético.

É cada vez mais comum identificar a presença ou ausência de uma espécie microbiana em uma amostra clínica ou ambiental por meio da hibridização com sondas específicas. Fragmentos de restrição do DNA cromossomal separados em gel de agarose podem ser transferidos para membranas de nitrocelulose e hibridizadas com sondas marcadas que consiste em DNA clonado da mesma espécie (Tompkins et al., 1986).

Uma abordagem alternativa envolve variações polimórficas de fragmentos de restrição (RFLP) entre moléculas de DNA relacionados, pode ser utilizada como um método de comparação de moléculas de DNA cromossomal para propósitos de identificação e caracterização.

A complexidade de alguns padrões de RFLP torna-os difíceis de fornecer informações para fins epidemiológicos. Entretanto, se os padrões complexos dos fragmentos de restrição são desnaturados e transferidos por técnicas de *blotting* do gel para uma membrana de nitrocelulose ou de nylon e depois hibridizado com uma sonda marcada, um padrão simples pode ser visualizado, que consiste apenas de fragmentos que geraram uma hibridização positiva com a sonda.

A ribotipagem tem várias vantagens sobre outros métodos. Em particular os genes ribossomais são extremamente estáveis. A maioria dos microrganismos possuem múltiplas cópias dos operons ribossomais, de forma que a hibridização gera um número aceitável de fragmentos que fornece um resultado positivo. É importante ressaltar que a habilidade discriminatória da ribotipagem depende de uma sonda precisa e enzimas de restrição igualmente adequadas.

Procedimentos de amplificação e técnicas de seqüenciamento

Os procedimentos de hibridização de ácidos nucléicos foram desenvolvidos de forma que pudessem ser utilizados diretamente com fins de identificação e caracterização de uma grande variedade de microrganismos, entretanto, o ácido nucléico está disponível em quantidades limitadas, antes do cultivo dos microrganismos. O cultivo não é possível para todas as espécies e para algumas outras é necessário um período muito longo para obtenção de quantidades suficiente de ácidos nucléicos para detecção por métodos de hibridização.

A aplicação de métodos de amplificação podem solucionar este problema através da amplificação de seqüências de DNA ou de RNA de interesse. Vários métodos de caracterização podem então ser usados para a análise do produto amplificado. O método mais simples é a utilização de um gel de eletroforese para identificar o tamanho dos produtos. Embora melhor especificidade e sensibilidade possam ser obtidos pela análise dos produtos de reação por hibridização com sondas específicas. O método mais informativo, entretanto, envolve a determinação da seqüência de nucleotídeos da molécula de DNA ou RNA amplificada. A identificação das variações na seqüência de nucleotídeos confere a mais precisa identificação e caracterização de microrganismos.

A identificação de uma seqüência específica do ácido nucléico é uma ferramenta de diagnóstico valiosa por causa da alta especificidade desta abordagem. Embora o seqüenciamento seja uma nova abordagem da identificação microbiana, não é, no presente uma técnica de uso rotineiro. Avanços na tecnologia de seqüenciamento de genes homólogos é uma técnica padrão em biologia molecular, especialmente valiosa quando genes conservados são seqüenciados para estabelecer relações evolucionárias e taxonômicas entre diferentes bactérias.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de uma seqüência específica foi introduzida por Saiki et al. (1985), e é uma das mais importantes inovações científicas da década passada, tem sido combinada com digestão com endonuclease de restrição de DNA amplificado para produzir RFLPs para análise em gel de agarose ou de poliacrilamida.

CONCLUSÕES

Embora os métodos epidemiológicos tradicionais detenham ainda um papel central no controle de infecção hospitalar, análises epidemiológicas moleculares podem elevar o controle da infecção. A combinação de técnicas moleculares como PCR podem auxiliar no diagnóstico da fonte de contaminação, bem como rastrear a disseminação de clones e controlar os surtos.

Métodos de seqüenciamento têm sido desenvolvidos tão rapidamente que seqüenciamentos comparativos de genes homólogos são, na atualidade, técnicas padrões em sistemática molecular e estudos filogenéticos. Genes conservados têm sido seqüenciados para estabelecer a posição particular de um determinado organismo em um esquema taxonômico.

Estudos realizados com MRSA, através de várias técnicas moleculares revelaram polimorfismos dentro do gene *mec* para as diferentes cepas, esse resultado suporta a hipótese de um ancestral comum para todos os genes *mec* dos MRSA isolados.

Estes métodos de caracterização quando utilizados apropriadamente e em conjunto com cuidadosa investigação epidemiológica fornecem uma abordagem efetiva na pesquisa e controle da distribuição de MRSA dentro de um hospital.

ABSTRACT

Since the introduction of antibiotics into clinical use, bacteria have protected themselves by developing antibiotic resistance mechanisms. Currently, there are increasing problems worldwide with multiresistant bacteria. These problems are especially evident within hospitals, where they frequently present as nosocomial epidemics. Nowadays, the most important nosocomial resistance problems, on a global scale, are caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The basic mechanism of resistance is the alteration in penicillin-binding proteins of the organism. The methods for isolation of MRSA by molecular typing characterization are reviewed in this work.

KEY-WORDS: nosocomial infection, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, molecular typing characterization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

el-ADHAMI, W. Epidemiological analysis of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak using restriction fragment length polymorphisms of genomic DNA. *J. Gen. Microbiol.*, v. 137, p. 2713-2720, 1991.

el-ADHAMI, W.; STEWART, P. R. Genome organization of *Staphylococcus aureus* isolates from different populations. *J. Med. Microbiol.*, v. 46, p. 297-306, 1997.

BACOT, C. M.; REEVES, R. H. Novel tRNA gene organization in the 16S-23S intergenic spacer of the *Streptococcus pneumoniae* rRNA gene cluster. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 4234-4236, 1991.

CARLES-NURIT, M. J. DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 2092-2096, 1992.

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, v. 234, p. 1582-1585, 1986.

COOLLEY, E. W.; McNICOL, M. N.; BRACKEN, P. M. Methicillin-resistant staphylococci in a general hospital. *Lancet*, v. 1, p. 595-597, 1965.

COTTER, L. et al. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak in a Irish hospital: triplex PCR and DNA amplification fingerprinting. *J. Hosp. Infect.*, v. 36, p. 37-47, 1997.

DAMIANI, G. et al. Comparison of an improved RAPD fingerprinting with different typing methods for discriminating clinical isolates of *Staphylococcus* spp. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 12, p. 163-169, 1996.

FRENAY, H. M. et al. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 846-847, 1994.

FRENAY, H. M. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 15, p. 60-64, 1996.

GIVNEY, R. et al. Evolution of an endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* population in an Australian hospital from 1967 to 1996. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 552-526, 1998.

GOH, S. H. et al. Molecular typing *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 1642-1645, 1992.

GOTTLIEB, P.; RUDNER, R. Restriction site polymorphism of ribosomal ribonucleic acid gene sets in members of the genus *Bacillus*. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, v. 35, p. 244-252, 1985.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v. 137B, p. 165-175, 1986.

GÜRTLER, V.; BARRIE, H. D. Typing *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA regions: characterizations of spacer sequences. *Microbiology*, v. 141, p. 1255-1265, 1995.

- HOEFNAGELS-SCHUERMANS, A. et al. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 2514-2520, 1997.
- HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequences analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 1083-1089, 1998.
- 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.
- KOBAYASHI, N. et al. Analysis of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms. *Epidemiol. Infect.*, v. 115, p. 419-426, 1995.
- KREISWIRTH, B. 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.
- LAWRENCE, C. et al. Use of the coagulase gene typing method for detection of carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 37, p. 687-696, 1996.
- LINA, B. et al. Comparison of coagulase-negative staphylococci by pulsed-field electrophoresis. *FEMS Microbiol Letters*, v. 92, p. 133-138, 1992.
- MENDOZA, M. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 48, p. 1049-1055, 1998.
- NADA, T. Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates. *J. Hosp. Infect.*, v. 32, p. 305-307, 1996.
- NAWAS, T. et al. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 414-420, 1998.
- NISHI, J. et al. Molecular typing of the methicillin resistance determinant (mec) of clinical strains of *Staphylococcus aureus* based on mec hypervariable region length polymorphisms. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 126, p. 29-35, 1995.
- PREVOST, G.; JAULHAC, B.; PIEMONT, Y. DNA fingerprinting by pulse-field electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 30, p. 967-973, 1992.
- 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.
- SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1530-1534, 1985.
- SAULNIER, P. et al. Single-step polymerase chain reaction for combined gene detection and epidemiological typing in three bacterial models. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 150, p. 311-316, 1997.

SAUNDERS, N.A. et al. A method for typing strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *J. Med. Microbiol.*, v. 31, p. 45-55, 1990.

SCHMITZ, F. J. et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *J. Med. Microbiol.*, v. 47, p. 341-351, 1998.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, v. 37, p. 67-75, 1984.

SCHWARZKOPF, A; KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 2407-2412, 1994.

SLATER, G.W.; NOOLANDI, J. Effect of non-parallel alternating fields on the mobility of DNA in the biased reptation model of gel electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 10, p. 413-428, 1989.

SRIVASTAVA, A. K.; SCHLESSINGER, D. Mechanism and regulation of ribosomal RNA processing. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 44, p. 105-129, 1990.

STELLWAGEN, N. C.; STELLWAGEN, J. Orientation of DNA and the agarose gel matrix in pulsed electric fields. *Electrophoresis*, v. 10, p. 332-344, 1989.

TAMBIC, A. et al. Analysis of an outbreak of non-phase-typable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 3092-3097, 1997.

TODHA, S.; MARUYAMA, M.; NARA, N. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction: distribution of the typed strains in hospitals. *Intern. Med.*, v. 36, p. 694-699, 1997.

TOMPKINS, L. S. et al. Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. *J. infec. Dis.*, v. 154, p. 156-162, 1986.

Van BELKUM, A. et al. Molecular nosocomial epidemiology: high speed typing of microbial pathogens by arbitrary primed polymerase chain reaction assays. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 16, p. 658-666, 1995.

Van BELKUM, A. et al. Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, v. 46, p. 222-232, 1997.

Van BELKUM, A. et al. Genetic homogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Saudi Arabia. *Microb. Drug. Resist.*, v. 3, p. 365-369, 1997.

Van BELKUM, A. et al. Polymerase chain reaction-mediated typing of microorganisms: tracking dissemination of genes and genomes. *Electrophoresis*, v. 19, p. 602-607, 1998.

VIOVY, J. L. Reptation breathing theory of pulsed electrophoresis – dynamic regimes, antiresonance and symmetry breakdown effects. *Electrophoresis*, v. 10, p. 429-441, 1989.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, v. 51, p. 221-271, 1987.