

CARACTERIZAÇÕES FENOTÍPICAS DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* (MRSA) ISOLADOS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

PHENOTYPICAL CHARACTERIZATIONS OF *Staphylococcus aureus* (MRSA) STRAINS ISOLATED FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Larissa Vilas Boas de Oliveira¹
Adriane Ceschin Maestri²
Luiza Souza Rodrigues³
Rayana Ariane Pereira Maciel⁴
Nelson Augusto Rosário Filho⁵
Jannaina Ferreira de Melo Vasco⁶

RESUMO

Fibrose Cística (FC) é uma doença causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) que resultam em danos nas propriedades viscoelásticas do muco respiratório, favorecendo o desenvolvimento de doença pulmonar supurativa, obstrutiva e progressiva. Em indivíduos com FC, há uma maior prevalência de culturas respiratórias positivas para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), que associado com a prejudicada função do trato respiratório, dificulta o tratamento e prognóstico de pacientes com FC. Este trabalho teve como objetivo caracterizar cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de pacientes com FC através de dois diferentes métodos fenotípicos para identificação de MRSA. Os isolados foram provenientes de amostras do trato respiratório de pacientes acompanhados no Ambulatório de Fibrose Cística do Complexo do Hospital de Clínicas (CHC) - UFPR, durante o período de maio a outubro de 2017. Foram realizadas provas bioquímicas microbiológicas para caracterização de 146 cepas de *S. aureus*. Para a detecção de MRSA, foram utilizados dois testes fenotípicos: crescimento em Ágar Cromogênico MRSA[®] e Teste de disco-difusão com Cefoxitina. Das 146 cepas analisadas, 37 (25,3%) cresceram no Ágar Cromogênico MRSA[®] e 12 (8,2%) delas foram resistentes ao disco de Cefoxitina. Portanto, houve discordância entre os dois testes realizados de 25 (17,1%) amostras, quando comparados um método com outro. A identificação apropriada de MRSA colonizador das vias aéreas e potencial patógeno é de extrema importância para o início de uma correta antibioticoterapia, pois há riscos que envolvem tratamentos prolongados e uso indiscriminado dessas drogas, com surgimento de novas estirpes cada vez mais resistentes.

Descritores: Fibrose cística; *Staphylococcus aureus*; MRSA.

¹Biomédica. Centro Universitário Autônomo do Brasil.

²Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Paraná (1991). Atualmente é Farmacêutico da Universidade Federal do Paraná.

³Possui graduação em Biomedicina pela Universidade de Uberaba. cursou o Aprimoramento Profissional em Patologia Clínica na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Mestre em ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

⁴Possui Doutorado e Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (Área de concentração: Patologia/Nefrologia Experimental) pela Universidade Federal do Paraná - UFPR, Bacharelado em Biomedicina (Habilitação em Análises Clínicas) pelo Centro Universitário Autônomo do Brasil - UniBrasil.

⁵Graduado em Medicina pela Universidade Federal do Paraná (1972), mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente pela Universidade Federal do Paraná (1980) e doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente pela Universidade Estadual de Campinas (1994). É especialista em Alergia Clínica pela State University of New York.

⁶Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PRPPG-UFPR) 2018. Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (com ênfase em Microbiologia) pela Universidade Federal do Paraná (2006), especialista em Microbiologia - com ênfase em Bacteriologia clínica e Micologia clínica pela PUC-PR (2004), graduada em Biomedicina pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela PUC-GO (1999).

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a disease caused by mutations in the *CFTR* gene (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) that result in damage to the viscoelastic properties of respiratory mucus, favoring the development of suppurative, obstructive and progressive lung disease. In individuals with CF, there is a higher prevalence of positive respiratory cultures for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which, together with impaired respiratory tract function, hinders the treatment and prognosis of CF patients. This work aimed to characterize strains of *S. aureus*, isolated from samples of CF patients through two different phenotypic methods for identification of MRSA. The isolates were obtained from samples from respiratory tract of patients followed at the Cystic Fibrosis Outpatient Clinic (CHC) - UFPR, from May to October 2017. Microbiological biochemical tests were performed to characterize 146 strains of *S. aureus*. For the detection of MRSA, two phenotypic tests were used: growth in Chromogenic Agar MRSA[®] and Disc-diffusion Test with Cefoxitin. Of 146 strains analyzed, 37 (25.3%) were grown in the MRSA Chromogenic Agar[®] and 12 (8.2%) of them were resistant to the Cefoxitin disc test. Therefore, there was disagreement between the two tests performed of 25 (17.1%) samples, when compared one method with another. Proper identification of MRSA colonizing pathways and pathogenic potential is of paramount importance for the initiation of a correct antibiotic therapy, since there are risks that involve prolonged treatments and indiscriminate use of these drugs, as well as favoring the emergence of new and increasingly resistant strains.

Descriptors: Cystic fibrosis; *Staphylococcus aureus*; MRSA.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) também denominada mucoviscidose é uma doença autossômica recessiva, causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), que codifica a proteína transmembrana chamada de CFTR (1,2). Essa proteína é responsável pelo transporte iônico na membrana celular e está diretamente envolvida na regulação do fluxo de íons cloreto (Cl⁻) nas células endoteliais (3). A proteína CFTR encontra-se presente em vários órgãos e devido ao seu mau funcionamento, essa patologia pode acarretar disfunção pancreática exócrina, desordem da motilidade intestinal, doença hepática, infertilidade masculina e concentrações elevadas de eletrólitos no suor (4,5).

O defeito na proteína CFTR resulta na alteração do equilíbrio eletrolítico na mucosa das vias aéreas, o que afeta as propriedades viscoelásticas do muco respiratório e por consequência ocorre o comprometimento das funções mucociliares de limpeza, principal fator que contribui para o início da colonização bacteriana nas vias aéreas dos pacientes fibrocísticos (6). Os produtos decorrentes do metabolismo bacteriano causam danos nas mucosas respiratórias e, com o decorrer do tempo, a resposta inflamatória também contribui para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (7). Sendo assim, o comprometimento das funções pulmonares é um dos principais quadros clínicos que contribuem na morbidade e mortalidade desses pacientes, que desenvolvem uma doença pulmonar supurativa, obstrutiva e progressiva (8,9).

Entre os principais microrganismos envolvidos nas infecções pulmonares nos pacientes com FC, estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Complexo Burkholderia cepacia* (6,10). O microrganismo mais comumente isolado em infecções pulmonares na FC é *P. aeruginosa*, sendo estabelecida uma associação entre a formação de biofilme, comprometimento das vias respiratórias de forma progressiva e morte (11). Contudo, *S. aureus*

O uso frequente de antimicrobianos por pacientes com FC no tratamento de infecções bacterianas pode ter contribuído para o aumento da resistência de cepas de *S. aureus*. Embora a terapia profilática antiestafilocócica tenha sido inicialmente eficaz contra o patógeno, o uso frequente desses antimicrobianos permite a seleção de cepas mais resistentes (12). Além disso, MRSA pode formar e residir em biofilmes, o que dificulta sua erradicação e é capaz de formar *Small Colony Variants* (SCV – tradução em português: Variantes de pequenas colônias), que pelo seu estilo de vida intracelular exibem a chamada resistência fenotípica ou funcional, além dos mecanismos clássicos de resistência. As SCV encontram-se associadas a taxas mais altas de resistência antimicrobiana e doença pulmonar mais avançada em FC (13). Durante a infecção, MRSA produz várias enzimas, como: proteases, lipases e elastases, as quais permitem a disseminação para outros sítios, invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro (14). Portanto, a determinação da patogênese desse microrganismo na FC e a identificação apropriada de MRSA colonizador das vias aéreas é de extrema importância para o início de uma antibioticoterapia adequada e eficaz.

O objetivo desse estudo é caracterizar isolados microbiológicos de MRSA em amostras do trato respiratório de pacientes diagnosticados com FC que fazem acompanhamento no ambulatório do Complexo do Hospital de Clínicas (CHC) – UFPR, através de dois testes fenotípicos.

METODOLOGIA

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Complexo Hospital de Clínicas UFPR (CHC), sob parecer nº2290.184/2010-07. Trata-se de um estudo retrospectivo, no qual foram identificadas cepas de *S. aureus* isoladas a partir de amostras de escarro e *swab* de orofaringe de pacientes diagnosticados com FC de ambos os gêneros e acompanhados no Ambulatório de Fibrose Cística do Complexo Hospital de Clínicas – UFPR.

Foram colhidas 194 amostras de pacientes com FC, sendo 146 (75,2%) com *S. aureus* e 48 (24,7%) com outros microrganismos. Como critério de inclusão foram analisadas as cepas de microrganismos previamente identificados no setor de Bacteriologia do CHC - UFPR como *S. aureus* e como critério de exclusão os isolados que não tinham sido identificados previamente como *S. aureus*.

As cepas foram transportadas em meio de cultura sólido (ágar) em tubo para o laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil), onde foram realizados os testes de viabilidade e pureza das colônias, semeando-as em ágares não seletivos (Ágar Sangue e Nutriente). Os ágares semeados foram incubados a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 h em estufa bacteriológica e posteriormente inoculadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com 15% de glicerol em criotubos e congelados entre -18 a -20°C , para análises posteriores.

Para o início das análises, as cepas foram descongeladas e semeadas em Ágar-Sangue de carneiro (AS) e incubadas por 24 a 48 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os microrganismos foram caracterizados fenotipicamente através de suas respectivas provas bioquímicas, utilizadas rotineiramente por técnicas microbiológicas padrões, segundo o manual da ASM (*American Society for Microbiology*). Após o crescimento em AS, foi iniciada a identificação morfotintorial pela Coloração de Gram e visualização da estrutura bacteriana ao microscópico óptico por imersão, na objetiva de 100X. As provas bioquímicas realizadas para confirmação de *S. aureus* foram: caracterização colonial, catalase, coagulase, DNase, crescimento e fermentação em ágar Manitol, meio seletivo para *S. aureus*.

Posteriormente, foram realizadas provas fenotípicas para caracterização de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina - MRSA usando Ágar Cromogênico MRSA[®] e Teste de disco-difusão com Cefoxitina. Para o teste com Ágar Cromogênico MRSA[®], foi inoculado a cepa teste pela técnica de semeadura por esgotamento de alça e então após a incubação foram verificados o crescimento colonial e a formação depigmentação no ágar. Para o teste de disco difusão em ágar com Cefoxitina (30 µg), foi utilizada a técnica de Kirby-Bauer padronizada de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*(15)), sendo observado após incubação a susceptibilidade da cepa frente a esse antimicrobiano.

Para a realização de todos os testes foram utilizadas cepas ATCC[®] (*American Type Culture Collection*) para o controle de qualidade dos resultados. As cepas utilizadas para controle positivo foram ATCC[®] 25923 (*Staphylococcus aureus*), ATCC[®] 700698 (*Staphylococcus*

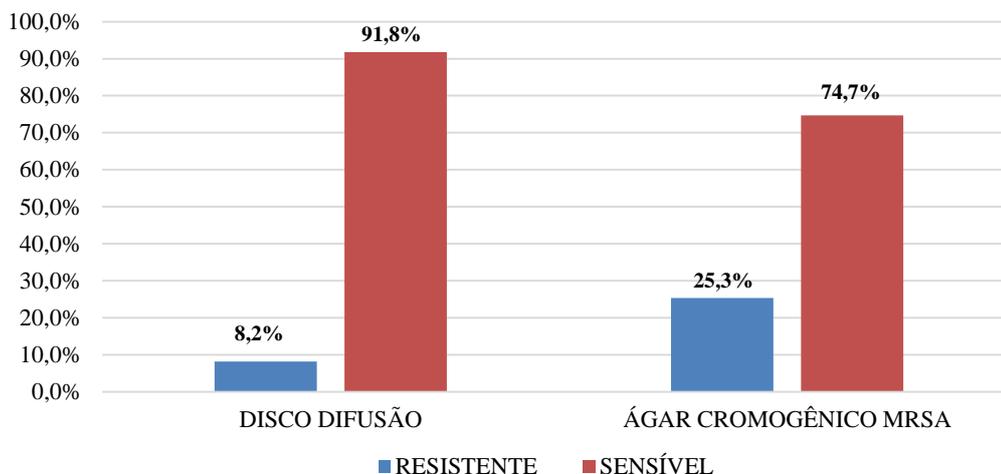
aureus resistente a meticilina – MRSA) e para controle negativo ATCC® 29212 (*Enterococcus faecalis*).

RESULTADOS

Foram analisadas 146 cepas de *S. aureus* de 102 pacientes, com idade variando de 2 meses a 76 anos. Dessas 146 cepas, 44 (30,1%) foram isoladas do mesmo paciente em período ou culturas diferentes. Nos resultados das provas bioquímicas microbiológicas padrões para a identificação de *S. aureus*, todas as cepas apresentaram crescimento em Ágar Sangue, catalase, coagulase e DNase positivas e pela característica morfotintorial foram observadas Cocos Gram Positivos (CGP) arranjados em cachos ou agrupados. Das cepas semeadas em ágar Manitol, todas tiveram crescimento, sendo que destas, 132 (90,4%) tiveram fermentação no ágar e 14 (9,5%) não fermentaram o açúcar. Através da análise macroscópica, em 75 (51,3%) das 146 cepas analisadas, foi observado o desenvolvimento de SCV, sendo destas 75 cepas de SCV, apenas 9 (6,16%) caracterizadas como *S. aureus* resistente a meticilina - MRSA.

No teste de disco difusão, 12 (8,2%) das cepas foram resistentes a ação de Cefoxitina e 91,8% foram sensíveis. No Ágar cromogênico MRSA®, 37 (25,3%) das cepas tiveram crescimento, fermentação do Manitol e apresentaram pigmentação específica para MRSA, o que sugere cepas resistentes (MRSA) e 74,7% das cepas não apresentaram crescimento no ágar, sugerindo cepas sensíveis (MSSA). Assim, de acordo com os resultados desses dois testes analisados, houve discordância em 25 (17,1%) isolados, quando comparamos um método com outro (Gráfico 1).

GRÁFICO 1. COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *S. AUREUS*



Legenda: Foram realizados o teste de disco difusão com o antimicrobiano Cefoxitina e cultivo em meio seletivo (Ágar cromogênico MRSA[®]). MRSA e 74,7% crescimento negativo.

DISCUSSÃO

Durante muitos anos *P. aeruginosa* foi a bactéria mais frequentemente isolada em culturas de secreções respiratórias e relacionada a piora do quadro de infecção pulmonar desenvolvida por pacientes com FC, sendo responsável por 58,8% dos casos até o ano de 2005, o que sugere uma forte associação ao dano respiratório progressivo e morte destes pacientes (16). A partir de 2005, a prevalência anual relatada de *P. aeruginosa* diminuiu significativamente, no entanto a incidência e a prevalência de MRSA aumentou. aumentou de 0,1% em 1995 para 17,2% em 2005 nos Estados Unidos em pacientes com FC. (17). Nos últimos anos foi observado o aumento da prevalência de infecções pulmonares em pacientes com FC, causadas por MRSA, no continente europeu e Estados Unidos (18) De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, em apenas seis meses de estudo, das 146 cepas de *S. aureus*, 14 (9,5%) obtiveram resultados positivos pelos dois testes fenotípicos, indicando uma possível cepa de MRSA.

A maioria das infecções causadas por MRSA estão associadas à assistência a saúde, ou seja, cepas adquiridas em âmbito hospitalar geralmente por conta da realização de procedimentos invasivos (19). A resistência à meticilina é devida a presença do *gene mecA*, que codifica as proteínas ligadoras de penicilina presentes na membrana bacteriana, o que diminui a afinidade com a classe de antibióticos β -lactâmicos. Os mecanismos de resistência a meticilina menos comuns podem ser encontrados nestas cepas, sendo mediada por plasmídeos que conferem a hiperprodução de β -lactamases, enzimas que quebram os anéis β -lactâmicos

dos antibióticos desta classe. Este mecanismo é conhecido como resistência *Boderline* (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus* – BORSA) (20,21).

Além de MRSA apresentar fatores de virulência comuns as cepas sensíveis a meticilina (aderência aos tecidos, produção de leucocidinas, hemolisinas, coagulases, catalases e de diversas outras toxinas), produzem biofilmes e maior adesão ao poliestireno, bem como nas células epiteliais brônquicas e maior propensão de invadir tecidos pela presença de domínios de ligação de fibronectina e são capazes de formar SCV, que podem contribuir para infecções persistentes e recorrentes, pois são capazes de “se esconder” nas células do hospedeiro sem causar danos significativos ou aparentes (22). Ainda, podem sair do seu estado vegetativo tornando-se mais virulentas, o que resulta em infecções recorrentes, o que causa um tempo maior de antibioticoterapia e períodos prolongados de internação, além de resultarem em uma função pulmonar mais comprometida (23). No presente estudo foi observado o desenvolvimento de SCV em 75 (51,3%) das 146 cepas analisadas. Dessas 75 cepas de SCV, apenas 9 (6,16%) foram posteriormente caracterizadas como sendo MRSA, similar ao trabalho de Wolter *et al.* (2013), em que foi observado aumento de SCV em culturas de pacientes com FC (13).

São vários os fatores que podem influenciar na escolha do método fenotípico a ser utilizado para a detecção de uma cepa de MRSA, desde a rapidez do resultado, custo, disponibilidade, sensibilidade e especificidade. O teste de disco difusão é o mais utilizado para a classificação de uma cepa quanto a sua resistência aos agentes antimicrobianos, sendo o resultado com maior influência na escolha terapêutica. Este método tem como vantagem a fácil reprodutibilidade e execução, materiais de baixo custo e não requer equipamentos especiais (24,25). A desvantagem pode estar em avaliar cepas heterorresistentes, que são capazes de apresentar vários níveis de resistência frente aos antibióticos, mesmo sendo células pertencentes da mesma colônia bacteriana. De acordo com a CLSI, só podem ser obtidos resultados confiáveis com os testes de disco difusão que usarem o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). O CLSI preconiza para a detecção de MRSA o uso de disco de Cefoxitina 30 µg (CFO) ou Oxacilina 10 µg (OXA) (15).

O uso do ágar cromogênico na prática microbiológica está cada vez mais comum, com a proposta de rapidez, confiabilidade e especificidade de espécie e resultados. Estes meios são compostos por substratos cromogênicos, que ao entrarem em contato com certas enzimas produzidas pelos microrganismos, resultam em colônias de coloração específica. No caso do

Ágar Cromogênico MRSA (Laborclin[®]), utilizado nesta pesquisa, MRSA produz coloração azul esverdeada. Este método apresenta vantagens, tais como a fácil reprodução e execução, não requisição de equipamentos especiais e possibilidade de isolamento do MRSA em apenas um passo (26,27).

Quando comparamos os dois testes, podemos citar algumas vantagens e desvantagens, sendo que o resultado definitivo do ágar Cromogênico pode demorar até 48h para ser observação de crescimento das colônias (como qualquer outro meio de cultura) e/ou liberado. O custo dessa metodologia é mais elevado relação ao teste de disco difusão, pois os ágar cromogênicos são mais custosos que os ágar comuns, juntamente com os discos de antimicrobianos utilizados rotineiramente. Ainda, o ágar Cromogênico está propenso a falhas frente a cepas heterorresistentes, pois se trata de um produto altamente sensível, com exigência de cuidados especiais. Sendo assim, os ágar perdem estabilidade e acurácia facilmente, não podem permanecer em temperatura ambiente mais que 72h, necessitam de armazenamento de 2 a 12°C e devem ser protegidos da ação direta da luz. Contudo, há a necessidade de ter um controle de qualidade bem implantado para a certeza de um resultado fidedigno..

O método considerado padrão ouro para a detecção de MRSA é o método molecular, a resistência é determinada através da detecção do *gene mecA*. Esta técnica pode ser realizada de duas formas distintas: por hibridização direta e por reação em cadeia da polimerase (PCR) (28,29). Apesar de ser considerada uma técnica padrão ouro, não é muito utilizada rotineiramente devido aos seus custos elevados, demora de resultado e por ser trabalhosa (30,31). Não foram realizadas técnicas moleculares no presente trabalho, mas as pesquisas continuarão com a inclusão desta análise por outros pesquisadores.

CONCLUSÕES

Devido ao fenômeno de heterorresistência e outros mecanismos de resistência apresentados pelas cepas de MRSA, tanto o método fenotípico, quanto o método molecular, podem apresentar dificuldades para a identificação final.

Apesar das divergências de resultados entre os métodos utilizados, o método de disco difusão é o de primeira escolha por se tratar de um método menos custoso e de mais rápido, porém, o ideal seria a combinação de diversos métodos para a melhor e mais ágil identificação da resistência.

Em consequência do aumento crescente de infecções pulmonares causadas por MRSA, a detecção correta da resistência e a identificação apropriada desse microrganismo colonizador das vias áreas é de extrema importância para o início de uma antibioticoterapia adequada e eficaz, além do controle da disseminação desse microrganismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon NOA, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* (80-). 1989;
2. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* (80-). 1989;
3. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: An intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*. 2002;
4. DH A. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*. 1938;
5. Koch C, H o iby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*. 1993;
6. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003.
7. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002.
8. Lutz L, De-Paris F. Bacteriologia da Fibrose Cística. *Clin* 2011;
9. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2015.
10. Marques EA. Perfil Microbiológico na Fibrose Cística. *Rev HUPE*. 2011;
11. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2009;
12. Smyth AR, Rosenfeld M. Prophylactic anti-staphylococcal antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017.
13. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children

- with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*. 2013;
14. Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol*. 2012;
 15. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
 16. Anzaudo MM, Busquets NP, Ronchi S, Mayoral C. Microorganismos patógenos aislados en muestras respiratorias de niños con fibrosis quística. *Rev Argent Microbiol*. 2005;
 17. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*. 2009;
 18. Muhlebach MS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis: How should it be managed? *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2017.
 19. Lo DKH, Hurley MN, Muhlebach MS, Smyth AR. Interventions for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015.
 20. Hryniewicz MM, Garbacz K. Borderline oxacillin-resistant staphylococcus aureus (BORSA) - a more common problem than expected? *Journal of Medical Microbiology*. 2017.
 21. Miller LG. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrobial Resistance*. 2010.
 22. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis*. 1998;
 23. Besier S, Smaczny C, Von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*. 2007;
 24. 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*. 2002;
 25. Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;
 26. Wassenberg MWM, Kluytmans JAJW, Box ATA, Bosboom RW, Buiting AGM, Van Elzakker EPM, et al. Rapid screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using

- PCR and chromogenic agar: A prospective study to evaluate costs and effects. *Clin Microbiol Infect.* 2010;
27. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley ALJ, Nicholson A, Kate Gould F. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2004;
 28. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;
 29. Pournajaf A, Ardebili A, Goudarzi L, Khodabandeh M, Narimani T, Abbaszadeh H. PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;
 30. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;
 31. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews.* 1997.