



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Botucatu

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

*Programa de Pós – Graduação em Doenças Tropicais*

**Camila Sena Martins de Souza**

***Staphylococcus aureus: Resistência aos antimicrobianos,  
fatores de virulência e tipagem de MRSA pelas  
técnicas de MLST e spa typing***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMB/UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**Co-orientador:** Prof<sup>º</sup>. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

**Botucatu – São Paulo**

**2014**



**Camila Sena Martins de Souza**

***Staphylococcus aureus*: Resistência aos antimicrobianos,  
fatores de virulência e tipagem de MRSA pelas  
técnicas de MLST e *spa typing***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMB/UNESP), para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**Co-orientador:** Prof<sup>o</sup>. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

**Botucatu – São Paulo**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Souza, Camila Sena Martins.

Staphylococcus aureus : resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência e tipagem de MRSA pelas técnicas de MLST e spa typing / Camila Sena Martins Souza. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Capes: 21201021

1. Staphylococcus aureus. 2. Virulência (Microbiologia). 3. Drogas - Resistência em microorganismos. 4. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Genes de virulência; MRSA; Resistência; Staphylococcus aureus.

*"É preciso força pra sonhar e perceber  
que a estrada vai além do que se vê".*

*(Los Hermanos)*

*“Aos meus pais, Cicero e Verônica que sempre me estimularam a dar este grande passo. Obrigada por serem minha razão e fonte de inspiração.”*

*“A vitória desta conquista eu dedico com todo meu amor, unicamente, a vocês!”*

*Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir chegar até aqui, por nunca me abandonar nos momentos que mais necessitei e por abençoar minhas viagens diárias.*

*A meus pais, Cicero Martins de Souza e Verônica Sena Barbosa Souza pelo exemplo de dignidade e perseverança, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores e pela sólida formação que me proporcionou a continuidade nos estudos. Meus eternos agradecimentos.*

*A meu irmão, Raphael Sena Martins de Souza pela constante torcida e por simplesmente fazer parte da minha vida.*

*Incluo, de forma muito especial, Luiz Domingues de Almeida Júnior, meu porto seguro, companheiro de todas as horas, pela sua compreensão, dedicação, tolerância e estímulo constante. Sem você tudo seria mais difícil. Obrigada por tudo.*

*À minha avó, Josefina Benedita Barbosa (“in memoriam”) grande guerreira, que tanto torceu pela minha vitória, mas não pode estar aqui para compartilhar desta conquista. Eternas saudades.*

*À Ariane Rocha Bartolomeu e Ayrir Marinho Monteiro companheiras de viagem, pelas inúmeras risadas, companheirismo e grande apoio nos momentos difíceis dessa etapa. Muito obrigada.*

*À Mônica da Silveira grande amiga do mestrado para a vida. Obrigada por essa convivência agradável e por me oferecer sua amizade sincera. Ao longo da vida encontramos poucas pessoas que nos marcam de forma tão especial e você é uma delas.*

*A Danilo Flávio Moraes Riboli e Patrícia Yoshida Faccioli Martins pela ajuda indispensável com as técnicas de tipagem. Meus mais sinceros agradecimentos.*

*Agradeço, de forma muito carinhosa a Luiz (Lula) por toda colaboração, amizade e alegria transmitida todos os dias.*

*Gostaria de expressar minha sincera gratidão a Marcus Vinícius Pimenta Rodrigues, que me proporcionou grandes oportunidades quando tudo ainda parecia impossível, jamais me esquecerei das portas que me abriu.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, essencial durante este período.*

*“Em especial, à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha exemplo de profissionalismo, pela dedicação oferecida desde a graduação, pelo constante incentivo nos momentos mais difíceis desta trajetória e pela confiança depositada em mim. Obrigada pela grande oportunidade, pois sem seu auxílio seria impossível a conclusão deste trabalho. Meu eterno agradecimento e admiração”*



## Resumo

*Staphylococcus aureus* se destaca por sua patogenicidade e alta frequência, permitindo que este agente seja capaz de produzir doenças tanto em indivíduos sadios quanto em imunocomprometidos por sua fácil disseminação. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a distribuição de clones de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (MSSA/MRSA) em 50 isolados provenientes de pacientes com infecções de pele da Seção de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (FMB) de Botucatu, 50 isolados de idosos de Instituições de Longa Permanência (ILP) de Bauru e 50 isolados provenientes de detentos do Centro de Ressocialização (CR) de Avaré. Os isolados de *S. aureus* foram submetidos à técnica de E-test para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para determinação do perfil de virulência e resistência à oxacilina nos 150 isolados de *S. aureus* foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos genes *mecA*, cassete cromossômico estafilocócio *mec* (SCC*mec*), genes codificadores das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina de Panton-Valentine (*lukS-PV* e *lukF-PV*), hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*) e biofilme (*icaA* e *icaD*). O perfil clonal dos isolados MSSA e MRSA foi caracterizado por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), e os clones de MRSA foram submetidos a tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *spa typing*. Os resultados revelaram maior prevalência de MRSA nas instituições de longa permanência, além de apresentarem CIM<sub>90</sub> 64µg/mL para oxacilina e CIM<sub>90</sub> >256 µg/mL para clindamicina. Das 150 amostras de *S. aureus* estudadas, 20 (13,3%) eram carreadoras do gene *mecA*, sendo detectados sete isolados albergando o SCC*mec* tipo IV, nove carreado o SCC*mec* tipo II, apenas um isolado carreado o SCC*mec* tipo I e 3 isolados não foram tipados pelo protocolo utilizado. Entre os fatores de virulência, a enterotoxina A foi a de maior prevalência em todas as origens. É importante ressaltar que 10% dos isolados provenientes do Centro de

Ressocialização (CR) carregavam o gene *tst* e 20% dos *S. aureus* de pacientes da Dermatologia apresentaram o gene *luk-PV*. Apenas isolados do CR e da Dermatologia apresentaram o gene que codifica a toxina esfoliativa A, além disso, mais de 90% dos isolados de *S. aureus* de todas as origens foram positivos para os genes das hemolisinas (*hla* e *hld*) e biofilme (*icaA* e *icaD*). A tipagem molecular para a determinação dos *clusters* sensíveis e resistentes realizada pela técnica de PFGE demonstrou grande disseminação de cepas entre pacientes, detentos e idosos. Através da técnica de MLST foi possível observar nas ILPs a presença de diferentes *sequence types* (STs) (2594, 2599, 105 e 1176), porém todas pertencentes ao mesmo *spa type* (t002). No CR os dois MRSA foram tipados como ST5, porém, os *spa types* foram distintos (t002 e t1062). Os três *clusters* obtidos na Dermatologia revelaram STs diferentes (83, 105 e 1176), assim como os *spa types* (t7083, t954 e t002). Apesar da distribuição de diferentes STs, todos pertenciam ao mesmo complexo clonal (CC5), provando que pertencem a uma origem comum. O estudo revelou que indivíduos assintomáticos apresentam uma prevalência significativa dos genes de virulência entre os isolados de *S. aureus*, com uma maior presença dos genes de produção do biofilme e hemolisinas. Além disso, os *clusters* encontrados no estudo demonstram a importância da implantação de novas medidas de prevenção e controle da disseminação desses micro-organismos nos hospitais e nas instituições fechadas.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, MRSA, genes de virulência, resistência.

## Abstract

*Staphylococcus aureus* is distinguished by its high pathogenicity and frequency, allowing that this agent is capable of producing diseases in both healthy individuals and immunocompromised due to its easy dissemination. The aim of this work was to characterize the distribution of clones of *S. aureus* sensitive and resistant (MSSA/MRSA) in 50 isolates from patients with skin infections of Section of Dermatology of the University Hospital of the Botucatu Medical School Hospital of the (FMB), 50 isolates of elderly residents of nursing homes of Bauru and 50 isolates from inmates of Detention Center of Avare. The isolates of *S. aureus* were subjected to the technique of E-test for determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). To determine the virulence profile and oxacillin resistance in 150 isolates of *S. aureus* was used Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *mecA* gene, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), genes encoding enterotoxins (*sea*, *seb* and *sec-1*), exfoliative toxins A and B (*eta* e *etb*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), Panton-Valentine leukocidin (*lukS-PV* and *lukF-PV*), alpha and delta hemolysin (*hla* and *hld*) and biofilm (*icaA* and *icaD*). The clonal profile of MRSA and MSSA isolates were characterized by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and MRSA clones were subjected to molecular typing Multilocus Sequence Typing (MLST) and *spa* typing. The results revealed a higher prevalence of MRSA in institutional settings, besides having MIC<sub>90</sub> 64µg/mL for oxacillin and MIC<sub>90</sub> > 256 mg/mL for clindamycin. Of the 150 samples of *S. aureus* studied, 20 (13.3%) were *mecA* carriers, being detected seven isolates harboring SCC*mec* type IV nine carrying the SCC*mec* type II, only one isolate carrying the SCC*mec* type I and 3 isolates were not typed by the protocol used. Among the virulence factors, enterotoxin A was the most prevalent in all sources. Is important to note, 10% of isolates from Center Resocialization (CR) carried the *tst* gene and 20% of *S. aureus* in dermatology patients

had the *luk-PV* gene. Only isolates of CR and Dermatology showed the gene encoding the exfoliatin A toxin. In addition, over 90% of the isolates of *S. aureus* from all sources were positive for hemolysin genes (*hla* and *hld*) and biofilm (*icaA* and *icaD*). The molecular typing for the determination of the sensitive and resistant clusters using the technique of PFGE showed great spread of strains between patients, inmates and the elderly. Through the technique of MLST was observed in ILPs the presence of different sequence types (STs) (2594, 2599 and 105 in 1176), but all belonging to the same spa type (t002). In CR the two MRSA were typed as ST5, however, were different spa types (t1062 and t002). The three clusters obtained in Dermatology revealed different STs (83, 105 and 1176) and the spa types (t7083, t954 and t002). Although the distribution of different STs, all belonged to the same clonal complex (CC5), proving that belong to a common origin. The study showed that asymptomatic individuals show a significant prevalence of virulence among isolates of *S. aureus*, with a greater presence of genes for production of the biofilm and hemolysin. Moreover, the clusters found in this study show the importance of implementing new measures to prevent and control the spread of these microorganisms in hospitals and institutional settings.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, MRSA, virulence genes, resistant.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes 16S RNAr e SA442. ....	13
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene <i>mecA</i> .....	15
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) em <i>S. aureus</i> . ....	16
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de genes de virulência. ....	17
<b>Tabela 5.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos sete genes <i>housekeeping</i> . ....	20
<b>Tabela 6.</b> Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene <i>spa</i> .....	21
<b>Tabela 7.</b> Características dos idosos, detentos e pacientes estudados. ....	23
<b>Tabela 8.</b> Determinação da susceptibilidade antimicrobiana através do método de E-test. ....	24
<b>Tabela 9.</b> Presença do gene de resistência à meticilina em <i>S. aureus</i> isolados de idosos, detentos e pacientes com infecções de pele. ....	25
<b>Tabela 10.</b> Classificação de SCC <i>mec</i> em <i>S. aureus</i> isolados de idosos, detentos e pacientes com infecções de pele. ....	25
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados de <i>S. aureus</i> sensíveis e resistentes. ....	28
<b>Tabela 12.</b> Análise da presença de genes de fatores de virulência em relação às amostras MRSA/MSSA. ....	29
<b>Tabela 13.</b> Análise dos fatores de virulência dos isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de idosos, detentos e pacientes com infecções de pele. ....	29
<b>Tabela 14.</b> Identificação do <i>sequence type</i> (ST) dos isolados de MRSA .....	34
<b>Tabela 15.</b> Identificação do <i>spa type</i> de MRSA. ....	35
<b>Tabela 16.</b> Características de virulência, resistência e perfil clonal dos isolados MRSA .....	36

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando os produtos amplificados do SCCmec nos isolados de MRSA das ILPs. L: Ladder 100pb; Amostras SCCmec II: 1 e 3-7; Amostras SCCmec IV: 2 e 11; Amostras não tipadas: 8-10..... 25
- Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de *Staphylococcus aureus* positivas para o gene da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*). L: Ladder 100pb; C+: Controle positivo da reação; C -: Controle negativo; Amostras positivas: 1-5..... 27
- Figura 3.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados carregados por idosos mantidos em Instituições de Longa Permanência..... 31
- Figura 4.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados carregados por detentos do Centro de Ressocialização..... 32
- Figura 5.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados carregados por pacientes da Dermatologia..... 33
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de *Staphylococcus aureus* positivas para os 7 genes *housekeeping*. L: Ladder 100pb; Amostras positivas: 1-*arcC* 570pb, 2-*aroE* 536pb, 3-*glpF* 534pb, 4-*gmk*\_488pb, 5-*pta*\_575pb, 6-*tpi*\_475pb e 7-*yqiL*598pb..... 35

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	2
<b>2. Objetivos</b> .....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	12
3.1 Amostragem .....	12
3.2 Local de estudo .....	12
3.3 Identificação de <i>S. aureus</i> .....	13
3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	13
3.5 Extração do ácido nucléico .....	14
3.6 Detecção do gene de resistência à meticilina em <i>S. aureus</i> ( <i>mecA</i> ) .....	15
3.7 Determinação do tipo de SCC <i>mec</i> ( <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> ).....	15
3.8 Detecção dos genes de virulência .....	16
3.9 Visualização dos produtos amplificados.....	17
3.10 PFGE - <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> .....	18
3.11 MLST – <i>Multilocus Sequence Typing</i> .....	19
3.12 Reação de sequenciamento .....	20
3.13 <i>spa typing</i> .....	20
3.14 Análise estatística.....	21
<b>4. Resultados</b> .....	23
4.1 Amostragem.....	23
4.2 Determinação da sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos.....	24
4.3 Detecção do gene <i>mecA</i> e caracterização do SCC <i>mec</i> .....	24
4.4 Distribuição dos genes de virulência .....	26
4.5 Perfil clonal dos isolados de <i>S. aureus</i> – <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> .....	30
4.6 <i>Multilocus Sequence Typing</i> – MLST.....	34

4.7 <i>spa</i> typing .....	35
<b>5. Discussão</b> .....	38
<b>6. Conclusão</b> .....	50
<b>Referências</b> .....	52
<b>ANEXO A.</b> Fluxograma da prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas nos estudos originais e das amostras incluídas nesse estudo.....	59
<b>ANEXO B.</b> Características das Instituições de Longa Permanência (ILPs) .....	60
<b>ANEXO C.</b> Aprovação do Comitê de Ética .....	61



## 1. Introdução

*Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais isolados tanto em infecções no ambiente hospitalar quanto na comunidade e representa um grande problema para os sistemas de saúde pública devido à facilidade de adquirir resistência aos antimicrobianos utilizados. É responsável por uma grande variedade de infecções, atingindo desde tecidos superficiais até os mais profundos onde penetram através do rompimento das barreiras naturais, sendo assim associados a doenças de pele e tecidos moles, a infecções graves como síndrome do choque tóxico e sepse que podem ser fatais. Com isso, destaca-se por sua patogenicidade e alta frequência, causando doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em sadios.<sup>1,2,3</sup>

A colonização nasal pelo *S. aureus* é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo não desenvolve infecção. Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contato.<sup>4</sup>

Em 1961 houve relatos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e até a década de 1990 foi considerado um patógeno nosocomial chamado de HA-MRSA (*Health-Care-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) com um número limitado de clones causando infecções graves em indivíduos com fatores de risco associados aos cuidados de saúde. No entanto, a transmissão na comunidade entre indivíduos sem fatores de risco tem sido reportada nos últimos anos. Nesse contexto, identificaram-se isolados com características genéticas específicas, denominados CA-MRSA (*Community-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*).<sup>5</sup>

Apesar da dificuldade na distinção entre essas cepas, CA-MRSA caracterizam-se por apresentarem maior susceptibilidade aos agentes não beta-lactâmicos, carregarem

principalmente o SCC*mec* tipo IV e possuem com maior frequência o gene da leucocidina Panton-Valentine (PVL).<sup>6</sup>

A incidência de CA-MRSA varia geograficamente e de acordo com sexo e idade, até a atual data há relatos que CA-MRSA tem afetado jovens, adultos e crianças. A transmissão tem ocorrido com facilidade entre detentos, atletas, soldados militares, homens que fazem sexo com homem, usuários de drogas injetáveis, pessoas com pele e mucosas comprometidas, hábitos de higiene precários e entre crianças de creches devido ao contato com secreções nasais contaminadas.<sup>7,8</sup>

Um fator comum desta propagação é a concentração de pessoas, contato físico pele a pele com lesões infecciosas ou danos na pele, o uso indiscriminado de antibióticos, partilha de objetos de uso pessoal que podem estar contaminados e que entram em contato com a pele não íntegra, além da prática deficiente de regras de higiene, como a falta de lavagem de mãos que podem propiciar a transmissão da bactéria.<sup>9</sup> Tal fato ocorre com frequência em ambientes prisionais que são focos de transmissão de patógenos, tornando essencial que as práticas de controle de infecção sejam reavaliadas e novas atitudes possam proteger a propagação deste micro-organismo, uma vez que os indivíduos mantidos no sistema prisional recebem frequentemente visitas familiares e íntimas podendo levar a uma disseminação para a comunidade.

Infecções de pele e tecidos moles estão entre as infecções bacterianas mais comuns em seres humanos, tanto na comunidade quanto em hospitais, e o tratamento é dificultado pelo aumento da frequência de MRSA nesses ambientes.<sup>10</sup>

Mais recentemente, as instituições de longa permanência (ILP) têm sido cada vez mais reconhecidas como reservatórios deste patógeno, isto pode ser devido à idade avançada dos idosos, estilo de vida, a necessidade de dispositivos invasivos, a presença de feridas crônicas, a dependência dos trabalhadores de saúde e hospitalização anterior, resultando em muitos

casos de colonização por MRSA que permanecem não reconhecidos e que levam a uma disseminação entre idosos, familiares e profissionais da área da saúde devido ao contato direto entre eles. Além disso, os idosos são considerados um grupo vulnerável que é internado nos hospitais com maior frequência podendo ser fonte desses micro-organismos na interface ambiente hospitalar e comunidade.<sup>11,12</sup>

Após a entrada no hospedeiro, um passo crítico para a infecção é a capacidade do agente patogênico de escapar do reconhecimento e destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro. Para este fim, *S. aureus* expressa diversos fatores de virulência que promovem a sobrevivência no hospedeiro e facilitam a patogênese. Isto inclui a produção de moléculas que provocam a lise da célula hospedeira e as que podem inibir as principais funções dos leucócitos, incluindo o recrutamento para o local da infecção, a fagocitose e atividade bactericida. Para o sucesso da infecção, *S. aureus* produz e secreta uma grande variedade de toxinas, proteínas de adesão, enzimas extracelulares e exotoxinas que são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções.<sup>13</sup>

*S. aureus* produz algumas exotoxinas como a toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e as toxinas esfoliativas (ETs). Entre elas, a TSST-1 e as enterotoxinas são conhecidas como superantígenos por possuírem a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T.<sup>14</sup> As enterotoxinas estão associadas a quadros de intoxicação alimentar, incluindo vômito, e atualmente são nomeadas de A-E, G-I, R, S e T.<sup>15</sup>

A leucocidina Pantón Valentine, característica das cepas de CA-MRSA, é uma toxina formadora de poros codificada pelos genes *LukS-PV* e *lukF-PV* e que causam destruição de leucócitos e necrose do tecido. Cepas produtoras de PVL têm sido associadas com a formação de abscesso na pele, furunculose e casos graves de pneumonia necrotizante.<sup>16</sup>

As hemolisinas são toxinas que apresentam atividade hemolítica, ou seja, capacidade de formar poros na membrana das células do sistema imune, atividade dermonecrotica

importante em infecções de pele e efeitos neurotóxicos.<sup>3</sup>

Além de expressar diversos fatores de virulência, *S. aureus* tem capacidade de formar biofilme na superfície de materiais estranhos ao organismo, como cateteres endovenosos e próteses, que funcionam como locais protegidos contra ação de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro, levando a dificuldades no tratamento.<sup>17</sup>

É importante ressaltar que a presença de MSSA também é de grande relevância por possuírem fatores de virulência que aumentam sua capacidade de invasão e sobrevivência levando a um maior poder de disseminação, e pelo fato desses micro-organismos serem a provável origem de cepas MRSA.

O surgimento de cepas MRSA é um desafio importante na terapia estafilocócica, uma vez que estas cepas são predominantemente resistentes a todos os beta-lactâmicos. O alvo de atuação dos antibióticos beta-lactâmicos são as chamadas proteínas ligadoras de penicilina (*Penicillin-Binding Protein-PBP*), proteínas de membrana envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana. Os beta-lactâmicos que interagem com as PBPs, impedem a formação completa da camada de peptidoglicano, desencadeando a morte bacteriana. Porém, na presença do gene *mecA*, ocorrem alterações das proteínas de ligação através da codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP 2a que apresenta baixa afinidade aos beta-lactâmicos. Os antibióticos beta-lactâmicos que são usados clinicamente não se ligam à PBP 2a em concentrações terapêuticas e, portanto, levam a uma falta de eficácia contra infecções causadas por MRSA.<sup>18,19</sup>

O gene *mecA* está localizado em um complexo genético móvel chamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). Até o momento, onze tipos de SCC*mec* têm sido descritos para *S. aureus*, utilizando a combinação de duas partes: o complexo *ccr* e o complexo *mec*, com três genes *ccr* filogeneticamente distintos classificados como: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*. Além disso, há seis classes do complexo gene *mec* (classe A, B, C1,

C2, D e classe E), sendo que na classe D não temos nenhum SCC*mec* descrito até o momento.<sup>19,20</sup>

Os diferentes tipos de SCC*mec* são classificados como: SCC*mec* tipo I (complexo gene *mec* classe B e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo II (complexo gene *mec* classe A e *ccrA2B2*), SCC*mec* tipo III (complexo gene *mec* classe A e *ccrA3B3*), SCC*mec* tipo IV (complexo gene *mec* classe B e *ccrA2B2*), e SCC*mec* tipo V (complexo gene *mec* classe C2 e *ccrC*), SCC*mec* tipo VI (complexo gene *mec* classe B e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo VII (complexo gene *mec* classe C1 e *ccrC*) e SCC*mec* tipo VIII (complexo gene *mec* classe A e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo IX (complexo gene *mec* classe C2 e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo X (complexo gene *mec* classe C1 e *ccrA1B6*) e SCC*mec* tipo XII (complexo gene *mec* classe E e *ccrA1B3*). A região restante do SCC*mec* é chamada de região J (*Joining region*), que possui componentes não essenciais do cassete que podem carrear determinantes de resistência antimicrobiana adicionais.<sup>20</sup>

Os métodos de tipagem surgiram devido às necessidades de técnicas eficazes para determinação da origem dos agentes patogênicos com alta taxa de virulência, transmissibilidade e resistência aos antibióticos. O método de tipagem mais utilizado é a Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), que se baseia na análise de fragmentos de DNA digerido por *SmaI*. Os fragmentos são comparados por PFGE e tipicamente agrupados de acordo com um coeficiente de similaridade de 80%, mas embora seja "padrão ouro" para MRSA apresenta várias desvantagens: requer habilidades, técnicas únicas, tem um custo elevado de instalação, e na comparação interlaboratorial dos resultados não é o melhor método, por isso as abordagens baseadas na sequência de DNA estão se tornando mais frequentemente utilizadas, pois as sequências podem ser facilmente transferidas entre laboratórios de diversos países.<sup>21,22</sup>

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método altamente discriminatório para

tipagem de cepas e caracteriza isolados com base na sequência de fragmentos internos de aproximadamente 450 pb de sete genes constitucionais (*housekeeping*), isto é, *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*\_, *pta*\_, *tpi*\_ e *yqiL*. Cada alelo recebe um número, onde através da combinação de alelos dos sete genes *housekeeping* é possível classificar cada isolado com um tipo de sequência (ST) que definem a origem evolutiva dos isolados, onde aqueles que compartilham mais de cinco alelos idênticos são agrupados em um mesmo complexo clonal, através da comparação com os alelos conhecidos em cada *locus* no banco de dados do MLST (<http://saureus.mlst.net>), sendo possível trabalhar com a epidemiologia local e global, a curto e a longo prazo.<sup>5,23</sup>

Outra técnica utilizada para tipagem de *S. aureus* é o *spa typing*, um método de sequenciamento de um único *locus* que determina as variações na sequência da região polimórfica X ou sequência de repetições curtas (SSR) do gene da proteína A, uma proteína de superfície que atua como um disfarce imunológico, sendo considerada um potente fator de virulência. A diversidade do gene *spa* consiste no número de pequenas sequências de repetições (*repeats*) contidas na região X, onde a diversidade da região SSR parece surgir da deleção e duplicação de repetitivas unidades e também por pontos de mutação. Um código alfa numérico é atribuído a diferentes repetições, definindo a ordem de repetições específicas como tipos de *spa*. Este *locus* é altamente polimórfico, devido a uma região interna de repetições curtas variáveis em *tandem*, que variam não só em número, mas também devido a substituições de nucleotídeos dentro das unidades de repetição individuais.<sup>5,21,24</sup>

A técnica fornece dados portáteis e inequívocos que têm demonstrado a sua utilidade para fins epidemiológicos como a transmissão e investigações de surtos em vários níveis geográficos com vantagens em termos de velocidade, facilidade de uso, padronização e reprodutibilidade quando comparada com a técnica de MLST.<sup>25</sup>

Controlar e entender *S. aureus* em ambos os ambientes hospitalares e da comunidade é

uma preocupação importante de saúde pública que é ressaltada pela contínua evolução e desenvolvimento de MRSA. Esse impacto causado na saúde humana levou a intensa investigação deste organismo nos últimos anos e a tipagem molecular tem uma importante contribuição por ser uma ferramenta que permite o estudo da origem clonal e epidemiologia de surtos de *S. aureus* desempenhando um papel crescente no controle de *S. aureus*.<sup>21</sup>

Os dados da literatura são escassos em relação aos isolados de MSSA, porém apresentam uma importância significativa, pois é necessário controlar e entender a disseminação de isolados sensíveis, uma vez que estes são a origem dos isolados resistentes e são disseminados muitas vezes de forma assintomática. Portanto, devido aos aspectos observados nos últimos anos o estudo da epidemiologia de MSSA é de extrema importância para melhor conhecimento do potencial patogênico desse micro-organismo visando melhores medidas de controle para a redução do risco de transmissão de *S. aureus* entre a população e no ambiente hospitalar.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar a distribuição de clones de MSSA e MRSA em amostras provenientes de três cidades do interior de São Paulo, identificando a prevalência de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos nos isolados incluídos no estudo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Oxacilina, Clindamicina, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Linezolida, Quinupristina/Dalfopristina e Vancomicina
- Detectar o gene *mecA* nas amostras de *S. aureus*.
- Caracterizar os tipos de SCC*mec* nas amostras de MRSA.
- Determinar genotipicamente os fatores de virulência para a produção das enterotoxinas clássicas, toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico, biofilme, leucocidina Panton Valentine, hemolisina alfa e delta e toxinas esfoliativas.
- Determinar a similaridade genética dos isolados pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE).
- Verificar a distribuição de clones de MRSA pelas técnicas de MLST e *spa typing*.



### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Amostragem

Foram analisadas um total de 150 amostras de *S. aureus*, sendo 50 amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes com infecções purulentas de pele e/ou de tecidos moles que procuraram atendimento em ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), 50 *swabs* nasais de presidiários mantidos no Centro de Ressocialização de Avaré, SP (CR) por um período mínimo de três meses, 50 *swabs* nasais de idosos acima de 60 anos mantidos em ILPs de Bauru, SP.

Foram excluídos do estudo amostras isoladas de indivíduos que foram internados em ambiente hospitalar até um ano antes da coleta, foram submetidos a procedimentos invasivos nos últimos doze meses e/ou fizeram uso de antibióticos nos trinta dias anteriores à coleta.

#### 3.2 Local de estudo

A população carcerária que participou deste estudo é proveniente do Centro de Ressocialização, um presídio Estadual administrado pelo Sistema de Administração Penitenciária (SAP) do Estado de São Paulo, possui 210 vagas distribuídas em três módulos, em forma da letra “U”; cada módulo possui seis alojamentos, e cada alojamento acolhe 12 detentos. Os detentos entram em contato com a população externa do presídio uma a duas vezes por semana, sendo obrigatoriamente parentes. Existiam exigências quanto ao banho diário, às roupas limpas, higiene pessoal e orientações constantes quanto a doenças infectocontagiosas. Todos os detentos que são inclusos no sistema passam pela enfermaria e recebem vacinas (hepatite B, tétano, sarampo, rubéola e caxumba) e as vacinas de febre amarela e influenza que são administradas quando orientado pela Secretaria de Saúde. Além disso, são realizados testes sorológicos (VDRL, HIV, hepatite B e C) na admissão do detento.

Os idosos incluídos nesse estudo são provenientes de 7 Instituições de Longa Permanência na cidade de Bauru e as características dessas ILPs são descritas no **Anexo B**.

Também foram incluídos no estudo pacientes com infecções purulentas de pele e/ou de tecidos moles que procuraram atendimento em ambulatório e/ou serviço de emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, na especialidade da Dermatologia. O Hospital das Clínicas da FMB possui nível de atendimento terciário, sendo referência para pacientes da cidade de Botucatu e de toda região.

### 3.3 Identificação de *S. aureus*

Os micro-organismos isolados foram submetidos à coloração de Gram objetivando-se a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram realizadas as provas de catalase, coagulase em tubo e as provas bioquímicas maltose, trealose e manitol para diferenciação de *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.<sup>26,27</sup>

A confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada através da detecção do gene 16S RNAr e SA442 após a extração do DNA (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes 16S RNAr e SA442.

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
16S RNAr 1	CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G	791
16S RNAr 2	CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG	
SA442 1	AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG	241
SA442 2	CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA	

Fonte: Mason et al.<sup>28</sup>; Martineau et al.<sup>29</sup>

### 3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas de *S. aureus* foi avaliada para oxacilina, clindamicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina, sulfametoxazol/trimetopim e vancomicina. Para tanto, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dessas

drogas, através do método de E-test. Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza tira de plástico inerte e transparente, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, na qual é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado. A concentração das diversas drogas no E-test varia de 0,002 a 256 µg/ml.

O resultado da CIM foi denominado sensível, intermediário ou resistente de acordo com as definições pré-estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).<sup>30</sup>

### 3.5 Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico foi extraído a partir de linhagens de *S. aureus* cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h.

Para a extração foi utilizado o Kit Illustra (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água MilliQ aquecida a 70°C que foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

### 3.6 Detecção do gene de resistência à meticilina em *S. aureus* (*mecA*)

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al. (**Tabela 2**)<sup>31</sup> Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene *mecA*

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
mecA1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 pb
mecA2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	

Fonte: Murakami et al.<sup>31</sup>

### 3.7 Determinação do tipo de SCC*mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*)

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se o método de reação de PCR Multiplex, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>32</sup> e atualizado por Milheiriço et al.<sup>33</sup>

Como controle para a tipagem do SCC*mec* foram utilizadas as cepas COL para SCC*mec* tipo I; N315 para SCC*mec* tipo IA; PER34 para o SCC*mec* tipo II; AN546 para o SCC*mec* tipo III; HU25 para o SCC*mec* tipo IIIA e MW2 para o SCC*mec* tipo IV (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em *S. aureus*.

Primer	Sequência de nucleotídeos	SCC <i>mec</i> /Região J	Produto (pb)
dcS F2	5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3'	I, II, IV e VI, região J3	342
dcS R1	5' – CTAATCATAGCCATGACCG – 3'		
<i>mecA</i> P4	5' – TCCAGATTACAACCTCACCAGG – 3'	Controle interno positivo	162
<i>mecA</i> P7	5' – CCACTTCATATCTTGTAACG – 3'		
cif2 F2	5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3'	I, região J1	495
cif2 R2	5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'		
<i>mecI</i> P2	5' – ATCAAGACTTGCATTCAGGC – 3'	II e III, complexo <i>mec</i>	209
<i>mecI</i> P3	5' – GCGGTTTCAATTCATTGTC – 3'		
rif5 F10	5' – TTCTTAAGTACACGCTGAATCG – 3'	III, região J3	414
rif5 R13	5' – GTCACAGTAATTCCATCAATGC – 3'		
ccrC F2	5' - GTACTCGTTACAATGTTTGG – 3'	V, complexo <i>ccr</i>	449
ccrC R2	5' – ATAATGGCTTCATGCTTACC – 3'		
kdp F1	5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3'	II, região J1	284
kdp R1	5' – CGAATGAAGTAAAGAAAGTGG – 3'		
SCC <i>mec</i> V J1 F	5' - TTCTCCATTCTTGTTTCATCC – 3'	V, região J1	377
SCC <i>mec</i> V J1 R	5' – AGAGACTACTGACTTAAGTGG – 3'		
ccrB2 F2	5' – AGTTTCTCAGAATTCGAACG – 3'	II and IV, complexo <i>ccr</i>	311
ccrB2 R2	5' – CCGATATAGAAWGGGTTAGC – 3'		
SCC <i>mec</i> III J1 F	5' – CATTGTGAAACACAGTACG – 3'	III, região J1	243
SCC <i>mec</i> III J1 R	5' – GTTATTGAGACTCCTAAAGC – 3'		

Fonte: Oliveira e Lencastre<sup>32</sup>; Milheiriço et al.<sup>33</sup>

### 3.8 Detecção dos genes de virulência

As reações de PCR para os genes das hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), assim como os primers utilizados, foram segundo descrito por Marconi et al.<sup>34</sup> As reações de amplificação dos genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), e para o gene da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) foram realizadas segundo Cunha et al.<sup>35</sup> e Johnson et al.<sup>36</sup> As reações para o gene leucocidina Panton-Valentine (*pvl*) e genes das toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*) foram realizadas segundo descrito por Tristan et al.<sup>37</sup> e Koning et al.<sup>38</sup> Amplificação dos genes *icaA* e *icaD*,

relacionados com a produção de biofilme, foi realizada conforme descrito por Arciola et al.<sup>39</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de genes de virulência.

Fator de virulência	Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto (pb)	Controle
Enterotoxina A	<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	ATCC
		SEA-2	GAACCTTCCATCAAAAACA		13565
Enterotoxina B	<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAAGTACAAACG	478	ATCC
		SEB-2	GACGGTACTCTATAAGTGCC		14458
Enterotoxina C	<i>sec</i>	SEC-1	GACATAAAAAGCTAGGAATTT	257	ATCC
		SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC		19095
Tox. 1 da Sínd. Choque Tóxico	<i>tst</i>	TSST-1	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	N315*
		TSST-2	TTTCCAATAACCACCCGTTT		
Biofilme	<i>icaA</i>	ICAA-1	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	188	ATCC
		ICAA-2	TCAGGCACTAACATCCAGCA		35983
	<i>icaD</i>	ICAD-1	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	ATCC
		ICAD-2	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		35983
Toxina Esfoliativa A	<i>eta</i>	ETA-1	CTAGTGCATTTGTTATTCAA	119	N5*
		ETA-2	TGCATTGACACCATAGTACT		
Toxina Esfoliativa B	<i>etb</i>	ETB-1	ACGGCTATATACATTCAATT	200	ZM*
		ETB-2	TCCATCGATAATATACCTAA		
Hemolisina $\alpha$	<i>hla</i>	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	N315
		HLA-2	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
Hemolisina $\delta$	<i>hld</i>	HLD-1	ATGGCAGCAGATATCATTTTC	357	N315
		HLD-2	CGTGAGCTTGGGAGAGAC		

### 3.9 Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1,0X. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com SYBR Safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

### 3.10 PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

A tipagem por PFGE dos isolados foi realizada segundo o protocolo modificado de McDougal et al.<sup>22</sup> As amostras foram colocadas em caldo BHI para crescimento durante 24h. Em um microtubo foi colocado 400µl da amostra crescida e centrifugada a 12.000 rpm por 50s. Depois de desprezado o sobrenadante e adicionado 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min a 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 5µl de Lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose *low melt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*, *Fermentas Life Science*, Canadá). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.1; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustadas para 1,25 e 0,5% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice  $\geq 80\%$  foi escolhido para determinação dos clusters.

### 3.11 MLST – *Multilocus Sequence Typing*

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al.<sup>40</sup> Cada par de primer amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb), estes são demonstrados na **Tabela 5**: carbamatoquinase (*arcC*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*).

Após a amplificação e sequenciamento dos sete genes *housekeeping*, as sequências foram analisadas e submetidas no site de forma a obter o número de identificação correspondente a cada um dos alelos. A combinação desses alelos indicou o tipo de sequência (ST) e o complexo clonal (CC) a que pertencem os isolados

A purificação foi realizada pelo *Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e a reação de sequenciamento é descrita no item **3.12**. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>).



**Tabela 5.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos sete genes *housekeeping*.

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto (pb)
Carbamato quinase	<i>arcC</i> -Up	TTGATTACACCAGCGCGTATTGTC	456
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
Desidrogenase do chiquimato	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
Glicerol quinase	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
Guanilato quinase	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	
Fosfato acetiltransferase	<i>pta</i> -Up	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
Triose-fosfato isomerase	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
Acetil coenzima A acetil transferase	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC	516
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Fonte: Enright et al.<sup>40</sup>

### 3.12 Reação de sequenciamento

As reações foram realizadas em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelos programas Mega, Laser Gene e *Bionumerics* (versão 7.1; Applied Maths, Bélgica).

### 3.13 *spa typing*

O *spa typing* foi realizado segundo as normas descritas por Shopsin et al.<sup>41</sup>, utilizando um controle negativo (água destilada estéril) e um controle positivo (ATCC 33591). Os primers utilizados são descritos na **Tabela 6**. A purificação do produto amplificado e o sequenciamento seguiram o mesmo protocolo da técnica de MLST, citado anteriormente, modificando somente os primers específicos.

A análise das sequências foi realizada pelo software *BioNumerics* (versão 6.1; *Applied Maths*, Bélgica) que sincroniza os dados com *SeqNet/Ridom Spa Server* (*Ridom Staphtype*,

Ridom GmbH, Würzburg, Alemanha).

**Tabela 6.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene *spa*

Primer	Sequência de nucleotídeos
Spa 1	AGACGATCCTTCGGTGAGC
Spa 2	GCTTTTGCAATGTCATTTACTG

### 3.14 Análise estatística

Para comparação entre as variáveis categóricas foram realizados testes não-paramétricos para proporção: Chi-quadrado e Teste Exato de Fischer (quando recomendável).

Foi utilizado parâmetro de significância de 0,05.

## 4. Resultados

### 4.1 Amostragem

Foram estudadas 150 amostras de *S. aureus*, sendo 50 provenientes de *swabs* nasais de reeducandos do Centro de Ressocialização de Avaré isoladas no período de 2009 a 2010, 50 de *swabs* nasais de idosos de sete ILPs da cidade de Bauru isoladas de 2011 a 2012 e 50 *swabs* de infecções de pele de pacientes do ambulatório da Seção de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu isoladas no período de 2008 a 2009. A prevalência de *S. aureus* dos estudos originais é demonstrada no **Anexo A**. As características dos idosos, detentos e pacientes estudados são demonstrados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Características dos idosos, detentos e pacientes estudados.

	Instituição de Longa Permanência (%)	Centro de Ressocialização (%)	Dermatologia (%)
Feminino	66 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	52 <sup>a</sup>
Idade (Média)	78,5 <sup>a</sup>	33,4 <sup>b</sup>	41,5 <sup>b</sup>
Hospitalização	26 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	14 <sup>a</sup>
Antibiótico	28 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	60 <sup>c</sup>
Beta-Lactâmicos	16 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	34 <sup>c</sup>
Quinolonas	8 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>
Macrolídeos	2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Clindamicina	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
Infecção de Pele	14 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>
Pneumonia	8 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
MRSA	22 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	14 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) ( $a \neq b \neq c$ )

#### 4.2 Determinação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

A **Tabela 7** apresenta a CIM 50% e CIM 90% dos 150 *S. aureus* incluídos no estudo. A CIM mais alta foi observada entre os isolados das instituições de longa permanência (ILPs), com MIC<sub>90</sub> de 64 µg/mL para oxacilina e MIC<sub>90</sub> >256 µg/mL para clindamicina.

**Tabela 8.** Determinação da suscetibilidade antimicrobiana através do método de E-test.

	ILPs		CR		Dermatologia	
	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)
Oxacilina	0,19	64	0,25	0,38	0,19	1,0
Trim/Sulfa	0,016	0,047	0,023	0,047	0,023	0,032
Clindamicina	0,016	>256	0,023	0,047	0,023	0,064
Linezolida	0,38	0,5	0,5	0,75	0,5	1,0
Quin/Dalfo	0,25	0,5	0,5	1,0	0,38	0,75
Vancomicina	0,5	1,0	0,75	1,0	0,75	1,0

Trim/Sulfa: Trimetoprim/Sulfametoxazol

Quin/Dalfo: Quinupristina/Dalfopristina

#### 4.3 Detecção do gene *mecA* e caracterização do SCC*mec*

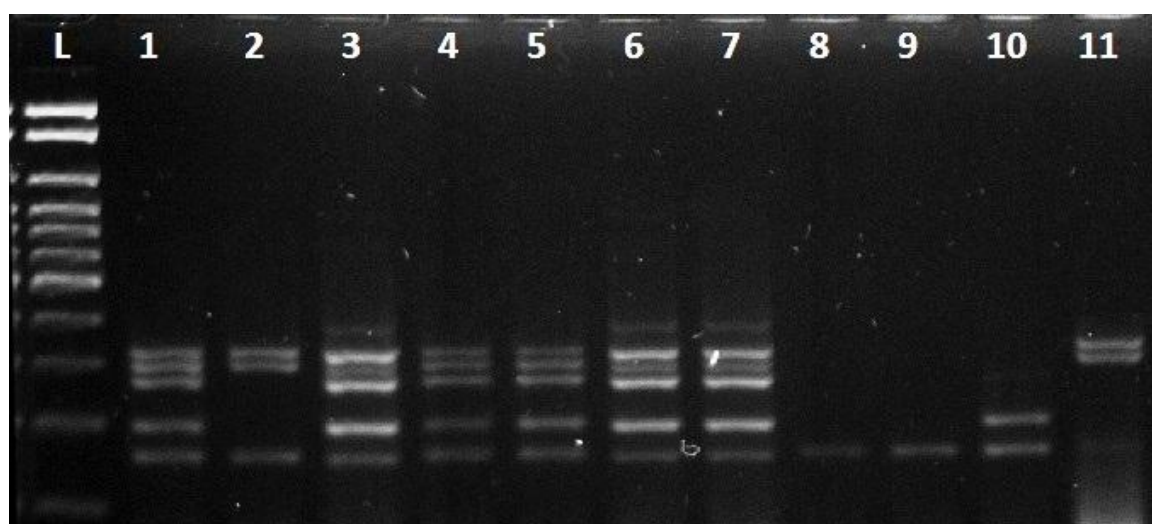
Das 150 amostras de *S. aureus* estudadas, 20 (13,3%) eram carreadoras do gene *mecA* (**Tabela 9**) com uma maior prevalência nos isolados provenientes de idosos das ILPs de Bauru/SP, sendo detectados sete isolados albergando o SCC*mec* tipo IV, nove carreado o SCC*mec* tipo II e apenas um isolado carreado o SCC*mec* tipo I (**Tabela 10**). As ILPs apresentaram SCC*mec* tanto de origem comunitária quanto relacionado à ambiente de assistência à saúde, uma vez que apesar de ser um ambiente comunitário, ocorre uma grande circulação de profissionais da saúde e além disso, os idosos se internam com frequência (**Figura 1**).

**Tabela 9.** Presença do gene de resistência à meticilina em *S. aureus* isolados de idosos, detentos e pacientes com infecções de pele.

Origem	MRSA	MSSA
Instituição de Longa Permanência	11	39
Centro de Ressocialização	02	48
Dermatologia	07	43

**Tabela 10** Classificação de SCCmec em *S. aureus* isolados de idosos, detentos e pacientes com infecções de pele.

Tipo de SCCmec	ILPs	CR	Dermatologia
SCCmec I	0	0	1
SCCmec II	6	0	3
SCCmec IV	2	2	3
Não Tipados	3	0	0



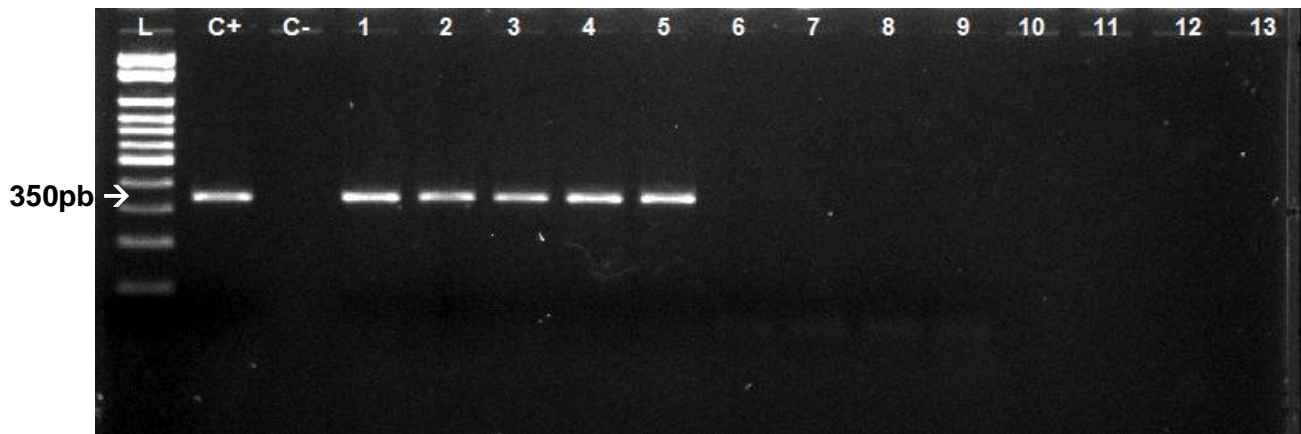
**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando os produtos amplificados do SCCmec nos isolados de MRSA das ILPs. L: Ladder 100pb; Amostras SCCmec II: 1 e 3-7; Amostras SCCmec IV: 2 e 11; Amostras não tipadas: 8-10.

#### 4.4 Distribuição dos genes de virulência

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao perfil genotípico de virulência pela técnica de PCR, com a detecção dos genes das enterotoxinas A, B e C (*sea*, *seb* e *sec-1*), toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina de Pantón Valentine (*LukPV*), hemolisina alfa e delta (*hla* e *hld*), toxinas esfoliativas A e B (*eta*, *etb*) e biofilme (*icaA* e *icaD*).

Os isolados avaliados apresentaram um perfil genotípico de virulência distinto entre origens. Em relação aos genes das enterotoxinas, 32% (16) das amostras isoladas de presidiários do Centro de Ressocialização foram positivas para o gene *sea*, 26% (13) positivas para o gene *seb* e 16% (8) positivas para o gene *sec-1*. Na Seção de Dermatologia 36% (18) dos isolados foram positivas para o gene *sea*, 20% (10) positivas para o gene *seb* e 16% (8) positivas para o gene *sec-1* e nas ILPs estudadas, 44% (22) foram positivas o gene *sea*, 30% (15) positivas para o gene *seb* e 4% (02) positivas para o gene *sec-1*. Um percentual considerável de isolados do Centro de Ressocialização 10% (5) apresentaram o gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico, porém, nenhum isolado das outras origens carregava o gene *tst* (**Figura 2**). A presença do gene *pvl* foi detectada apenas em isolados provenientes da Seção de Dermatologia em uma quantidade significativa de 20% (10). O gene da esfoliatina A (*eta*) era carregado por 4% (2) dos isolados do CR e por apenas 2% (1) da Dermatologia, já o gene *etb* não foi detectado nas amostras estudadas. Em relação aos genes das hemolisinas alfa e beta, foram detectados, em respectivamente, 90% e 88% na Dermatologia e ambos os genes em 98% no CR e 100% nos isolados das ILP. Em relação à produção de biofilme 100% (50) foram positivas para o gene *icaA* e 94% (47) para o *icaD* dos isolados provenientes da Dermatologia, o CR apresentou 100% (50) para o gene *icaA* e 90% (45) para o *icaD* e nas ILP 100% (50) foram positivas para o gene *icaA* e 100% dos isolados carregavam o gene *icaD*. A distribuição dos fatores de virulência em relação aos isolados sensíveis e resistentes é demonstrada na **Tabela 11** e **12**, onde é possível observar que não houve diferença estatística

na virulência de isolados MRSA e MSSA demonstrando que os isolados sensíveis não são menos virulentos que os isolados resistentes. A análise da distribuição dos fatores de virulência é demonstrada na **Tabela 13**.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR<sup>®</sup> Safe) evidenciando amostras de *Staphylococcus aureus* positivas para o gene da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*). L: Ladder 100pb; C+: Controle positivo da reação; C -: Controle negativo; Amostras positivas: 1 – 5.

Tabela 11. Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes.

Origem		Enterotoxinas			Esfoliatinas		Hemolisinas		Leucocidina	TSST-1	Biofilme	
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec-1</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>hla</i>	<i>hld</i>	<i>pvl</i>	<i>tst</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
ILPs	MRSA (n=11)	06 (54,5%)	01 (9%)	0	0	0	11 (100%)	11 (100%)	0	0	11 (100%)	11 (100%)
	MSSA (n=39)	16 (41%)	14 (36%)	02 (5,1%)	0	0	39 (100%)	39 (100%)	0	0	39 (100%)	39 (100%)
Centro de Ressocialização	MRSA (n=02)	0	0	01 (50%)	0	0	02 (100%)	02 (100%)	0	0	02 (100%)	01 (50%)
	MSSA (n=48)	16 (33,3%)	13 (27%)	07 (14,6%)	02 (4,1%)	0	47 (97,9%)	47 (97,9%)	0	09 (18,8%)	48 (100%)	43 (89,6%)
Dermatologia	MRSA (n=07)	02 (28,5%)	01 (14,2%)	0	0	0	06 (85,7%)	05 (71,4%)	0	0	07 (100%)	07 (100%)
	MSSA (n=43)	16 (37,2%)	09 (21%)	08 (18,6%)	01 (2,3%)	0	39 (90,7%)	39 (90,7%)	10 (23,6%)	0	43 (100%)	40 (93%)



**Tabela 12.** Análise da presença de genes de fatores de virulência em relação às amostras MRSA/MSSA.

	MRSA (20) n° (%)	MSSA (130) n° (%)	OR (IC 95%)	p
<i>pvl</i>	0 (0,0)	10 (7,7)	-	0,4
<i>tst</i>	0 (0,0)	5 (3,8)	-	1,0
<i>sea</i>	8 (40,0)	48 (36,2)	1,17 (0,45-3,09)	0,7
<i>seb</i>	2 (10,0)	36 (27,7)	0,29 (0,06-1,31)	0,09
<i>sec-1</i>	1 (5,0)	17 (13,1)	0,35 (0,04-2,79)	0,5
<i>icaA</i>	20 (20)	130 (100)	-	-
<i>icaD</i>	20 (10,0)	122 (93,8)	-	0,6
<i>eta</i>	0 (0,0)	3 (2,3)	-	1,0
<i>etb</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	-	-
<i>hla</i>	19 (95,0)	125 (96,2)	9,76 (0,08-6,86)	0,6
<i>hld</i>	18 (90,0)	125 (26,2)	0,36 (0,07-1,99)	0,2

Nível de significância  $p \leq 0,05$

**Tabela 13.** Análise dos fatores de virulência dos isolados de *S. aureus* provenientes de idosos, detentos e pacientes com infecções de pele

	Instituição de Longa Permanência (%)	Centro de Ressocialização (%)	Dermatologia (%)
<i>pvl</i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>
<i>tst</i>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
<i>sea</i>	44 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>
<i>seb</i>	30 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
<i>sec</i>	4 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>
<i>icaA</i>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<i>icaD</i>	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>
<i>eta</i>	0 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
<i>etb</i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<i>hla</i>	100 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>
<i>hld</i>	100 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	88 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) ( $a \neq b \neq c$ )

#### 4.5 Perfil clonal dos isolados de *S. aureus* – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

A análise do perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico dos isolados de *S. aureus* sensíveis provenientes das ILPs permitiu identificar a presença de 4 *clusters* com similaridade  $\geq 80\%$ , que foram nomeados de A-D, onde no *cluster* A, 4 das 5 amostras se apresentaram como idênticas, demonstrando a grande transmissão entre os idosos (**Figura 3**) e entre as diferentes ILP, o *cluster* B apresentou isolados de uma única ILP, assim como o *cluster* C, onde todas foram idênticas demonstrando a intensa disseminação de cepas. No Centro de Ressocialização, dentre os agrupamentos encontrados foram identificados 4 *clusters* majoritários (E-H), onde no *cluster* G, 4 das 5 amostras se apresentaram como idênticas, comprovando a disseminação no interior do presídio (**Figura 4**). A Seção de Dermatologia apresentou 4 *clusters* (I-L), apresentando isolados idênticos em diversas áreas do dendrograma (**Figura 5**). Entre os isolados resistentes do CR não ocorreu agrupamento, porém, entre os pacientes da dermatologia houve a presença de dois *clusters*, já os idosos apresentaram três *clusters*. Além disso, não foi possível observar a presença de clone único entre as três origens.

Após a triagem pela técnica de PFGE os clones foram caracterizados através da técnica de MLST conforme protocolo desenvolvido por Enright et al.<sup>40</sup>

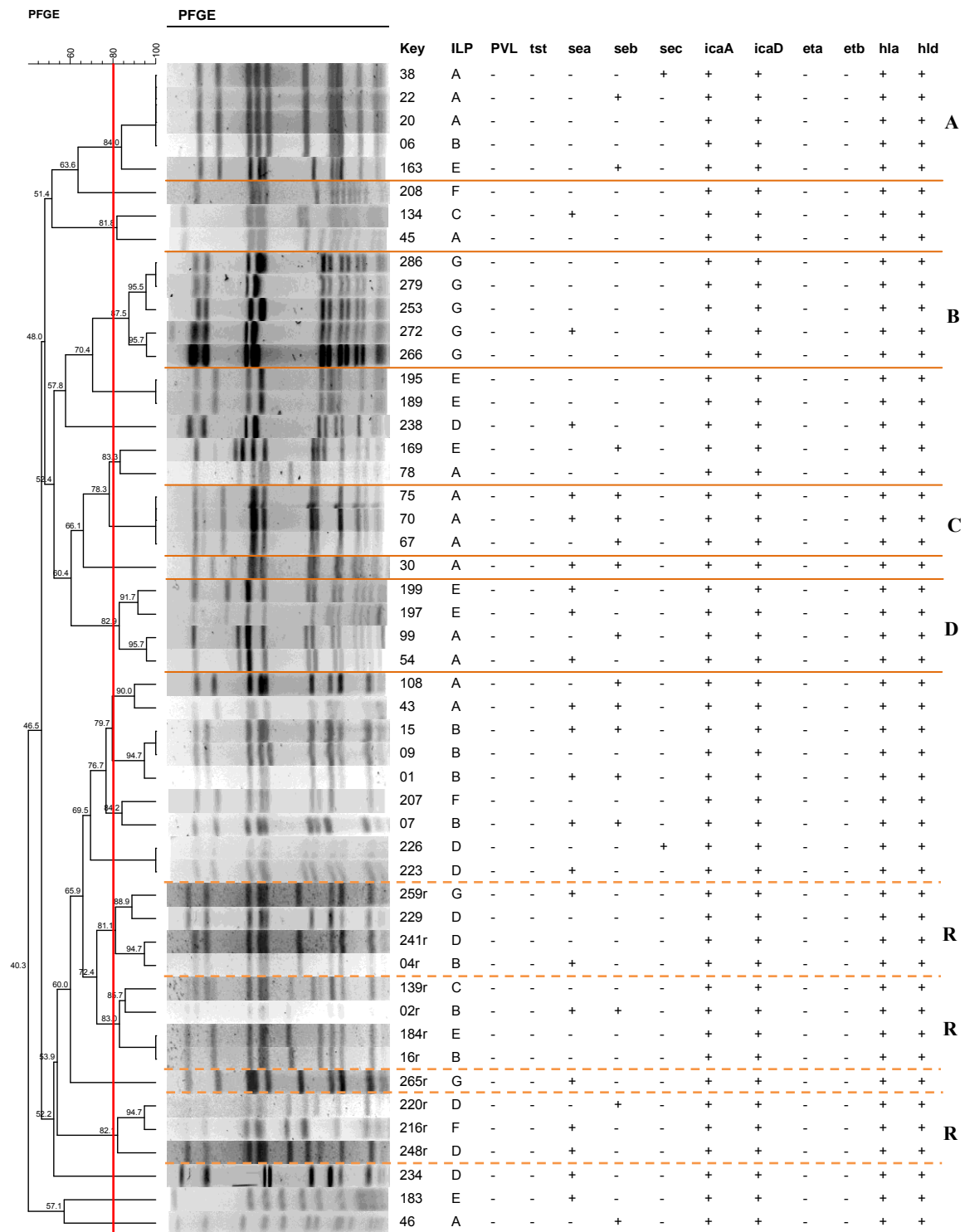


Figura 3. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados carreados por idosos mantidos em Instituições de Longa Permanência.

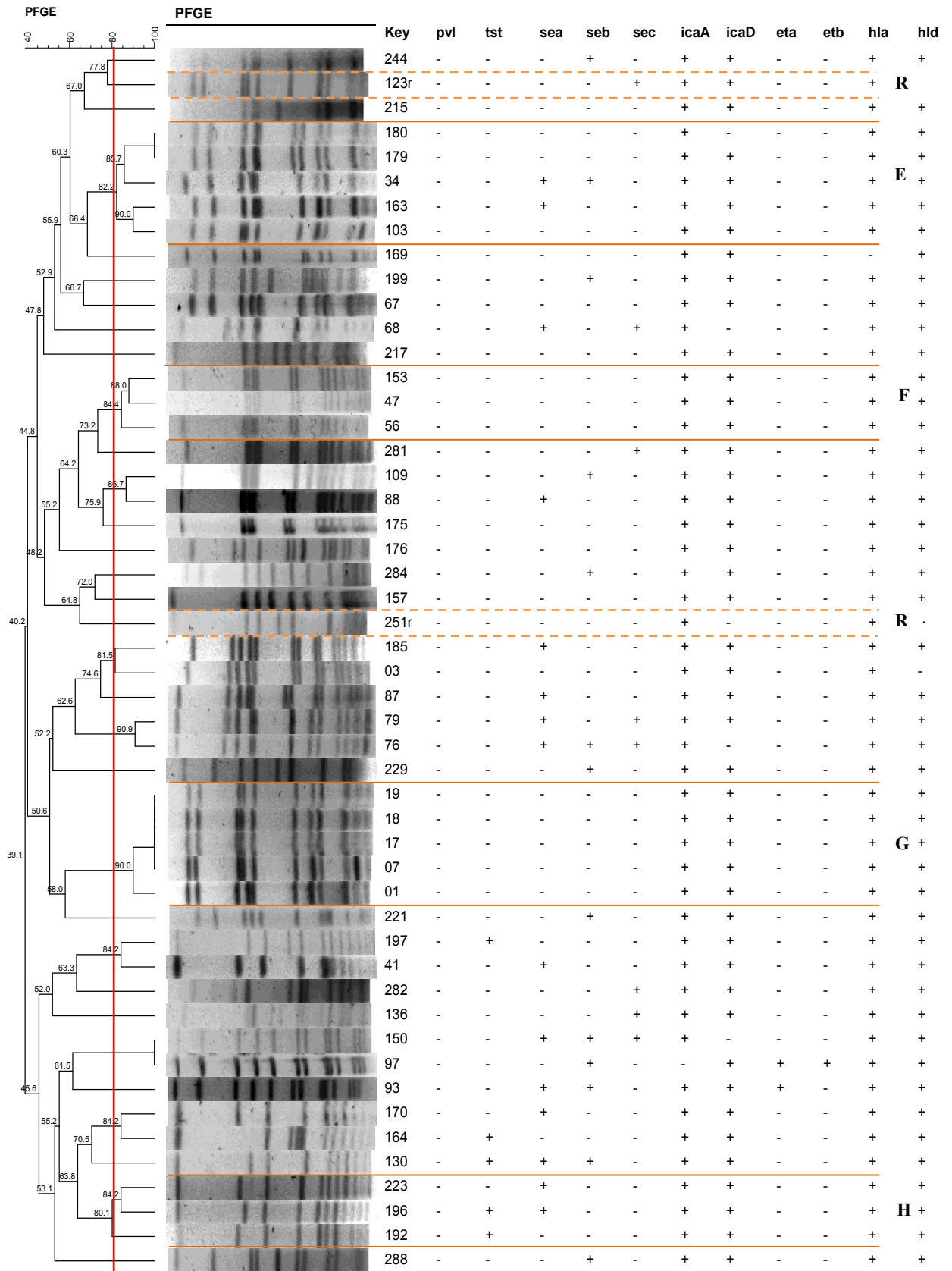


Figura 4. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados carregados por detentos do Centro de Ressocialização.

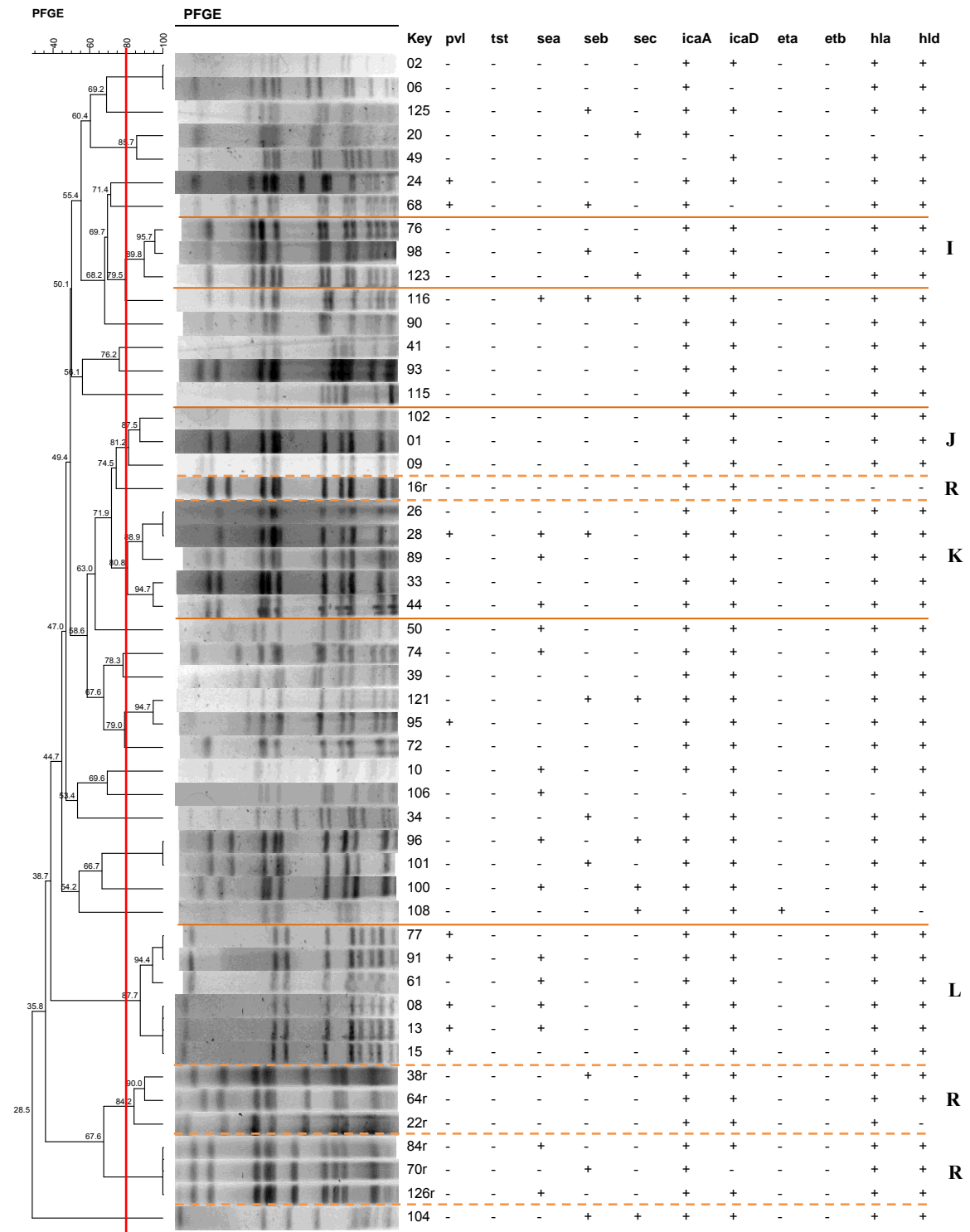


Figura 5. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados carreados por pacientes da Dermatologia.

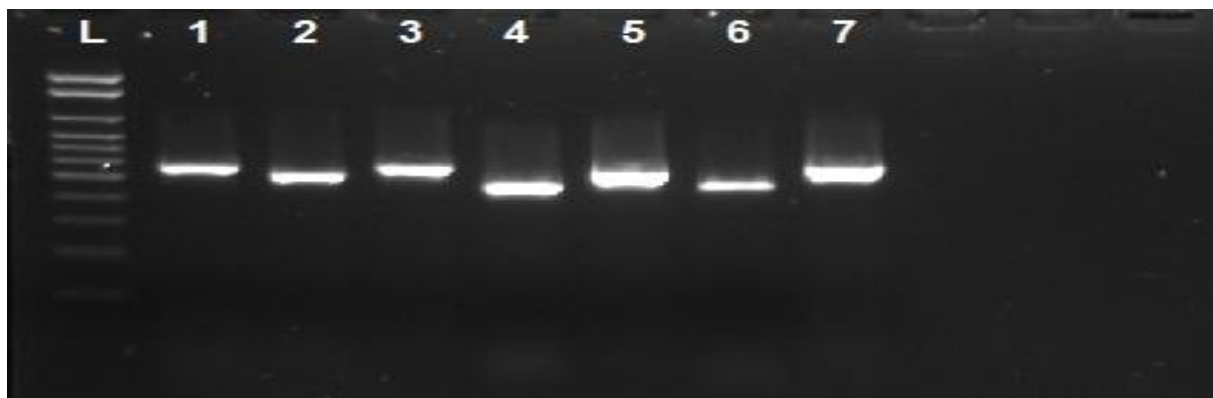
#### 4.6 Multilocus Sequence Typing – MLST

Dentro de cada perfil clonal de MRSA foi selecionado um isolado para ser submetido à técnica de MLST através da amplificação dos sete genes *housekeeping* (**Figura 6**). Com isso, é possível observar que os STs foram distintos (**Tabela 14**), porém todos provenientes do mesmo complexo clonal (CC) revelando uma origem comum. A relação entre virulência, resistência e perfil clonal é descrita na **Tabela 16**, demonstrando a presença de STs e *SCCmec* distintos dentro do mesmo CC.

**Tabela 14.** Identificação do *sequence type* (ST) dos isolados de MRSA

Origem	Amostra	Alelos							ST	CC
		<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk_</i>	<i>pta_</i>	<i>tpi_</i>	<i>yqiL</i>		
ILPs	02	1	31	1	4	12	1	28	2599	5
	220	1	4	1	4	12	1	28	105	5
	241	1	4	320	4	12	1	10	2594	5
	265	1	4	1	4	12	1	130	1176	5
	229*	1	223	1	4	12	1	10	1635	5
CR	123	1	4	1	4	12	1	10	5	5
	251	1	4	1	4	12	1	10	5	5
Dermatologia	16	1	4	1	4	12	1	1	83	5
	22	1	4	1	4	12	1	28	105	5
	84	1	4	1	4	12	1	130	1176	5

\* Isolado sensível agrupado com isolado resistente através do método de PFGE.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de *Staphylococcus aureus* positivas para os 7 genes *housekeeping*. L: Ladder 100pb; Amostras positivas: 1-*arcC* 570pb, 2-*aroE* 536pb, 3-*glpF* 534pb, 4-*gmk* 488pb, 5-*pta* 575pb, 6-*tpi* 475pb e 7-*yqiL* 598pb.

#### 4.7 *spa* typing

Após a análise pelo MLST o isolado foi submetido à técnica de *spa* typing, demonstrando uma grande prevalência do t002 e isolados com *spa* types distintos, porém sabe-se que todos apresentam uma origem comum (**Tabela 15**). A relação entre virulência, resistência e perfil clonal é descrita na **Tabela 16**, onde é possível observar que isolados com o mesmo ST podem apresentar *spa* types distintos, mas com a mesma origem clonal.

**Tabela 15.** Identificação do *spa* type de MRSA.

Origem	Amostra	<i>spa</i> type	<i>Repeat sequence</i>										
ILPs	02	t002	26	23	17	34	17	20	17	12	17	16	
	220	t002	26	23	17	34	17	20	17	12	17	16	
	241	t002	26	23	17	34	17	20	17	12	17	16	
	265	t002	26	23	17	34	17	20	17	12	17	16	
	229*	t002	26	23	17	34	17	20	17	12	17	16	
CR	123	t002	26	23	17	34	17	20	17	12	17	16	
	251	t1062	26	23	17	34	17	02	17	12	17	16	
Dermatologia	16	t7083	26	23	17	34	17	20		12	17	16	
	22	t954	26	23	17	34	17		17			16	
	84	t002	26	23	17	34	17	20	23	17	34	17	

\* Isolado sensível agrupado com isolado resistente através do método de PFGE.

Tabela 16. Características de virulência, resistência e perfil clonal dos isolados MRSA.

Origem	Amostra	Fatores de virulência											SCCmec	ST	CC	spa
		sea	seb	sec-1	eta	etb	hla	hld	pvl	tst	icaA	icaD				
ILPs	02	■	■				■	■			■	■	II	2599	5	t002
	220						■	■			■	■	II	105	5	t002
	241						■	■			■	■	NT	2594	5	t002
	265	■					■	■			■	■	NT	1176	5	t002
	229*						■	■			■	■	-	1635	5	t002
CR	123			■			■	■			■	■	IV	5	5	t002
	251						■	■			■	■	IV	5	5	t1062
Dermatologia	16										■	■	I	83	5	t7083
	22						■				■	■	IV	105	5	t954
	84	■					■	■			■	■	II	1176	5	t002



## 5. Discussão

O uso excessivo de antibióticos na medicina moderna exerce uma pressão seletiva sobre bactérias, impulsionando a ascensão de bactérias multirresistentes, entre elas MRSA que constitui uma das principais ameaças à saúde pública.<sup>42,43</sup>

Em nosso estudo realizado em ambiente prisional, apenas dois detentos estavam colonizados com *S. aureus* resistentes a oxacilina e os demais isolados se apresentaram sensíveis para todos os antimicrobianos testados, apresentando tanto CIM<sub>50</sub> quanto CIM<sub>90</sub> sensíveis. Corroborando com estudos realizados por Maree et al.<sup>44</sup> que encontraram 100% de sensibilidade ao trimetoprim/sulfametoxazol e vancomicina e 95% de sensibilidade para clindamicina em isolados provenientes de uma população carcerária de uma prisão de Los Angeles.

A baixa prevalência de MRSA nesse presídio pode ser explicada pelo fato de possuir somente 210 detentos, sendo possível um melhor controle da saúde local, o que permite uma educação em saúde mais frequente e voltada para a realidade local. Porém, estratégias para o controle de antimicrobianos é essencial para prevenir a disseminação destas cepas na comunidade carcerária, devido à aglomeração de pessoas compartilhando objetos pessoais, além de manterem contato direto, pele a pele e visitas que podem facilitar a transmissão cruzada de cepas de *S. aureus*.

Em relação às ILPs, estas apresentaram onze isolados resistentes a oxacilina, entre estes, sete isolados apresentaram resistência simultânea à clindamicina. A CIM<sub>50</sub> foi sensível para todas as drogas testadas, porém, a CIM<sub>90</sub> se apresentou resistente para oxacilina com 64µg e para clindamicina  $\geq 256\mu\text{g}$ . Nossos resultados se apresentam semelhantes aos encontrados por Denis et al.<sup>45</sup> que estudavam cepas provenientes de residentes na Bélgica, onde 26% dos MRSA eram resistentes a clindamicina e 100% sensível a linezolida. Além disso, CIMs semelhantes para trimetoprim/sulfametoxazol, quinupristina/dalfopristina,

linezolid e vancomicina foram encontrados por McDanel et al.<sup>46</sup> enquanto analisavam isolados de *S. aureus* provenientes de residentes de uma casa de repouso na Califórnia. Os profissionais de saúde devem estar atentos em relação às medidas de prevenção e controle em ambientes como ILP, além disso, a educação em saúde dos profissionais que atuam nessas instituições se faz necessária para esse controle.

Na Seção de Dermatologia, sete isolados apresentaram resistência a oxacilina, com quatro destes apresentando CIM  $\geq 256\mu\text{g}$  para clindamicina. Os três isolados resistentes a oxacilina, porém, sensíveis a clindamicina carregavam o SCCmec Tipo IV, corroborando com a literatura que relata que isolados com esse tipo de SCCmec são sensíveis à clindamicina.

Em relação à pesquisa do gene de resistência à oxacilina (*mecA*), as duas amostras isoladas de detentos que foram positivas para o gene, albergavam SCCmec Tipo IV, concordando com estudos realizados por Lowy et al.<sup>47</sup> que determinaram a prevalência de colonização nasal por *S. aureus* em duas prisões do Estado de Nova York e todos os MRSA carregavam o SCCmec Tipo IV, tipicamente presente na comunidade. Na Seção de Dermatologia, sete isolados eram carreadores do gene *mecA*, apenas um com o SCCmec Tipo I, três com SCCmec Tipo II e três com SCCmec Tipo IV. Estudos realizados por Miller et al.<sup>48</sup> com isolados provenientes de pacientes com infecções de pele também encontraram SCCmec Tipo II e IV sendo os mais prevalentes. Entre os onze idosos com amostras de MRSA, seis apresentavam SCCmec Tipo II, dois isolados eram SCCmec Tipo IV e três não foram tipados pela técnica utilizada.

O conhecimento do perfil patogênico de *S. aureus* colabora para um melhor entendimento e estratégias de controle e tratamento das infecções causadas por esses microorganismos. Um fato relevante é que apenas os pacientes da Dermatologia carregavam amostras positivas para o gene *pvl*, sendo representadas por 20% (10), estas foram isoladas de infecções primárias e secundárias e apresentaram sensibilidade à oxacilina, ou seja, nenhum

isolado de MRSA carregou o gene da PVL, demonstrando que este estudo contrapõe a afirmativa de que o gene da PVL seja um bom marcador entre cepas de CA-MRSA, pois tal resultado não foi obtido neste trabalho. Porém, estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Boyle-Vavra e Daum<sup>49</sup>, que sugerem que primeiramente *S. aureus* sensível à oxacilina é infectado e lisogenizado pelo fago que carrega os genes da PVL e, posteriormente adquirem o gene *mecA* através da transferência horizontal. Chen et al.<sup>50</sup> também não encontraram isolados de *S. aureus* carregando o gene da PVL entre MRSA estudados. De forma similar, Horner et al.<sup>12</sup> também não encontraram MRSA carregando o gene *pvl* isolados de idosos de 65 casas de repouso do Reino Unido.

Um total de 85 indivíduos apresentava infecção de pele no momento da coleta e apenas 10 (11,8%) carregavam o gene *pvl*, demonstrando uma significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) e sua relação com infecções de pele, uma vez que pode levar a necrose tecidual devido a liberação de espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios.

As exotoxinas possuem propriedades superantigênicas que são responsáveis pelas respostas inflamatórias que contribuem para a gravidade de infecções estafilocócicas. Entre elas estão as enterotoxinas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico<sup>51</sup>. Um fato relevante é a presença do gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico em 10% (5) dos isolados do Centro de Ressocialização. A TSST-1 é um superantígeno pirogênico conhecido por causar alteração da homeostase do sistema imune do hospedeiro, com proliferação de células T e liberação descontrolada de citocinas pró-inflamatórias, por se ligar de forma inespecífica ao complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) e células apresentadoras de antígeno e receptores de células T, levando a uma produção exacerbada de citocinas.<sup>52</sup>

Diante da distribuição dos genes de virulência relacionados às enterotoxinas clássicas. O gene *sea* esteve presente em 36% (18) dos *S. aureus* isolados de pacientes da Dermatologia, seguido das amostras isoladas de detentos com 44% (22) e finalmente dos idosos

apresentando 30% (15) de positividade para o gene. O gene *seb* esteve presente em maior número nas amostras de *S. aureus* isoladas de idosos 30% (15), seguido dos detentos com 26% (13) e por fim, os pacientes da Dermatologia com 20% (10). A enterotoxina B além de ser responsável por intoxicações alimentares também pode levar a TSS não menstrual.<sup>53</sup> Em relação ao gene *sec*, os detentos e os pacientes ambos carregavam o gene em 16% (8) e apenas 4% (2) das amostras de idosos foram positivas.

Nossos resultados apontam para uma maior prevalência do gene da enterotoxina A, corroborando com estudos realizados por Ghaznavi-Rad et al.<sup>51</sup> e Lim et al.<sup>54</sup> que também relataram uma maior prevalência do gene *sea* quando comparado as outras enterotoxinas em amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes hospitalizados, entretanto a maior prevalência em *S. aureus* com esse gene em indivíduos saudáveis é um dado novo.

Um total de 42% (63) dos isolados não carregavam nenhum dos genes das enterotoxinas, 58% (87) carregavam ao menos um gene para as enterotoxinas clássicas e entre essas apenas três carregavam simultaneamente os três genes para as enterotoxinas, sendo um isolado da Seção de Dermatologia e dois do Centro de Ressocialização.

A presença de genes dessas toxinas em MRSA e MSSA de pacientes e indivíduos saudáveis implica na possibilidade de maior disseminação bacteriana e infecções mais graves, já que essas toxinas permitem a ativação inespecífica de células T e liberação exacerbada de citocinas, podendo causar episódios de sepse grave.<sup>53</sup>

A colonização por *S. aureus* é uma característica de várias doenças inflamatórias da pele, que muitas vezes é seguida de dano epidérmico e infecção invasiva. As hemolisinas são grandes responsáveis por esses danos devido a sua atividade dermonecrotica.<sup>55</sup> A alfa-hemolisina atua criando poros na membrana alvo e a hemolisina delta tem ação surfactante, ambas agindo na lise dos eritrócitos.<sup>56</sup> Os resultados mostraram uma grande prevalência do

gene da hemolisina alfa e delta, sendo detectados, em respectivamente, 90% e 88% em pacientes na Dermatologia e ambos os genes em 98% no CR e 100% nos isolados das ILPs.

Segundo Lo et al.<sup>57</sup>, a capacidade hemolítica determina a patogenicidade de diversos agentes bacterianos, uma vez que ao degradar os tecidos do hospedeiro permitem a invasão, disseminação e escape do sistema imune.

Diversos fatores de virulência implicam na patogênese de *S. aureus* e entre eles as esfoliatinas. Entre os isolados do CR 4% (2) carregavam o gene *eta* e apenas um paciente da Dermatologia que no momento da coleta apresentava impetigo bolhoso, o que pode ser devido a uma expressão do gene *eta* pela bactéria. Porém, o gene *etb* não foi encontrado, corroborando com resultados obtidos por Lim et al.<sup>54</sup> em estudo com isolados de MRSA e MSSA que não carregavam esfoliatina B.

Além deste, outro fato relevante é a presença de genes responsáveis pela produção de biofilme em praticamente 100% das amostras estudadas, explicando porque os *Staphylococcus* spp. são reconhecidos como os principais agentes causadores de infecções associadas a dispositivos médicos, como cateteres e próteses.<sup>58</sup> O gene *icaA* codifica a enzima responsável pela síntese do polissacarídeo de adesão intracelular (PIA), e a co-expressão do *icaD* leva a um aumento da atividade do *icaA*.<sup>59</sup> Os resultados mostram 98% (48) de positividade para o gene *icaA* e 94% (47) para o *icaD* nos isolados provenientes da Dermatologia, o CR apresentou 100% (50) para o gene *icaA* e 90% (45) para o *icaD* e nas ILPs 100% (50) foram positivas para o gene *icaA* e 100% dos isolados carregavam o gene *icaD*. Os resultados apresentados são diferentes dos encontrados por Diamond-Hernández et al.<sup>59</sup> que sugerem que isolados invasivos são mais propensos a produzir biofilme que isolados carregados por indivíduos saudáveis.

Através do conhecimento do perfil patogênico de *S. aureus* é possível se obter um melhor entendimento e maior controle já que se tornaram um dos principais agentes

causadores de doenças relacionadas à assistência à saúde (IRAS). No entanto, apesar do grande conhecimento sobre a disseminação clonal de MRSA, sabe-se pouco sobre a epidemiologia molecular das cepas de MSSA.

A análise do perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico dos isolados sensíveis provenientes das ILPs permitiu identificar a presença de 4 *clusters* majoritários (A-D), sendo que no *cluster* A, três isolados da mesma ILP (A) se apresentaram como idênticas (100% de similaridade), demonstrando a grande transmissão de uma única cepa sensível entre os idosos de uma mesma ILP. Porém, é importante lembrar que nesta ILP não foi encontrado nenhum isolado resistente e demonstrava excelente higiene. No *cluster* B e C (G e A) também observou-se que todos isolados são da mesma ILP com alta taxa de similaridade, demonstrando disseminação de um mesmo clone entre os vários idosos de uma mesma instituição. Porém, mais preocupante foi o *cluster* D que revelou isolados similares pertencentes à ILPs distintas, podendo sugerir a disseminação por transferência de idosos ou por profissionais de saúde em comum entre as ILPs.

Em relação aos MRSA, os agrupamentos aconteceram entre distintas ILPs, demonstrando uma maior disseminação. É importante ressaltar um isolado sensível (229) que agrupou com isolado resistente com similaridade de 88,9%, segundo Enright et al.<sup>40</sup> a explicação mais provável para a relação entre essas cepas é a origem do MRSA a partir de cepas MSSA que adquirem o gene *mecA* de resistência a meticilina por transferência horizontal. Esses autores relataram que três clones de MSSA representam clones virulentos e com maior capacidade de causar doença em indivíduos saudáveis. Entre eles, o clone mais prevalente era constituído por 17 isolados e esteve intimamente relacionado com um clone de MRSA e que o sucesso do clone em causar infecções graves é devido à sua emergência a partir de um clone de MSSA virulento que já era uma das principais causas de doença invasiva, tanto na comunidade como em ambientes hospitalares.

No Centro de Ressocialização, os agrupamentos de MSSA revelaram quatro *clusters* majoritários (E-H), onde os presidiários de cada *cluster* apresentavam ligações entre os isolados, sendo do mesmo alojamento, trabalho ou provenientes da mesma unidade prisional. No *cluster* E, quatro detentos (34, 163, 179 e 180) apresentavam a mesma unidade prisional como origem. Dois *clusters* (F e G) se destacaram pelo fato de possuírem positividade para os mesmos genes revelando a presença de clones virulentos que podem se disseminar para a comunidade com maior facilidade. Um fato importante é a presença do gene *tst* em amostras de *S. aureus* isoladas de presidiários. Essa toxina é um superantígeno pirogênico conhecido por causar a síndrome do choque tóxico com profundas perturbações na homeostasia do sistema imune.<sup>52</sup>

No *cluster* F dois isolados (56 e 153) eram provenientes da mesma unidade prisional e todos faziam uso de álcool, tabaco e apresentavam doença de pele no momento da coleta. Já o *cluster* G, apresentou quatro isolados idênticos, comprovando a disseminação de clones entre os presidiários estudados. Além disso, dois isolados (7 e 18) trabalhavam na faxina.

O *cluster* H apresentou dois isolados (192 e 196) do mesmo alojamento, e dois que trabalhavam na faxina (196 e 223) e todos pertenciam a unidades prisionais distintas e faziam uso de tabaco e maconha.

Em relação aos isolados resistentes, estes tinham características em comum como o uso de álcool, tabaco, maconha e cocaína, ambos apresentavam doença de pele no momento da coleta e recebiam visita íntima com frequência.

A presença de *clusters* entre os isolados provenientes da Dermatologia, como o *cluster* de isolados resistentes e idênticos, chama a atenção para a necessidade da implantação de medidas de controle mais eficazes, uma vez que eram pacientes atendidos em ambulatórios, sem contato entre si, demonstrando a disseminação das cepas no ambiente hospitalar que podem ser levadas para a comunidade gerando graves infecções.

Grundmann et al.<sup>60</sup> relatam que pouco se sabe sobre a abundância geográfica de MSSA, que é o reservatório genético a partir do qual emerge o MRSA, revelando a importância de estudos relacionados a cepas sensíveis. Além disso, as diferenças na patogenicidade e virulência entre MRSA e MSSA continuam sendo uma questão não resolvida, já que não se sabe se os clones de MSSA que circulam no ambiente hospitalar ou comunidade tem capacidade especial para causar infecções graves.<sup>61</sup>

O estudo revelou uma prevalência significativa dos genes de virulência em cepas de MSSA e MRSA de portadores assintomáticos de *S. aureus*, com uma maior presença dos genes de produção do biofilme e hemolisinas. Além disso, demonstra que não houve diferença significativa entre isolados resistentes e sensíveis em relação a virulência, o que reforça a necessidade de uma maior atenção aos isolados sensíveis.

Os *clusters* encontrados no estudo demonstram a importância da implantação de novas medidas de prevenção e controle da disseminação desses micro-organismos nas instituições fechadas e no ambiente hospitalar.

A tipagem molecular de *S. aureus* é comumente usada para a identificação de supostas transmissões entre indivíduos, bem como para a vigilância de clones nacionais e internacionais.<sup>62</sup> Para a análise das relações evolutivas entre MRSA foi utilizado o algoritmo eBURST, a fim de identificar grupos de genótipos relacionados, ou seja, CCs, e prever o genótipo ancestral de cada grupo.

Segundo Rodriguez-Noriega et al.<sup>63</sup> vários clones estão sendo detectados nas regiões do Brasil e em particular, clones relacionados ao clone pediátrico, pertencente ao CC5, que se disseminaram amplamente e desenvolveram resistência a múltiplas drogas na América Latina, estando entre os cinco maiores complexos clonais causadores de infecções em todo o mundo, pois é composto por diversos clones pandêmicos de MRSA. Nossos resultados também



demonstram a grande disseminação do complexo clonal 5, uma vez que todos isolados tipados são pertencentes ao CC5.

No Ambulatório da Dermatologia foram encontrados três diferentes STs (83, 105 e 1176). Estudos realizados por Pacheco et al.<sup>64</sup> no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo com pacientes da Dermatologia também encontraram o ST1176, além disso, nenhum isolado carregava o gene *tst* concordando com nosso estudo. Os achados também corroboram com estudos realizados em dois hospitais de Miami, onde também foi encontrado o ST83 e 105, variantes do ST5. O ST105 se difere do ST5 por uma única mutação de uma base do alelo *yqiL*.<sup>65,66</sup>

No Centro de Ressocialização ambos isolados se apresentaram como SCCmec IV e ST5, porém com *spa* distintos (t002 e t1062), porém, é importante ressaltar que a diferença entre eles está em apenas um *repeat*, demonstrando uma origem comum entre os isolados. Estudos com resultados semelhantes foram realizados por Gardella et al.<sup>67</sup> onde demonstraram a prevalência de SCCmec tipo IV, ST5 e *spa* distintos em crianças saudáveis com menos de 48 horas de admissão em seis centros de saúde da Argentina

Em relação aos isolados provenientes das ILPs, apresentaram STs distintos (105, 1176, 2594 e 2596), mas todos pertencem ao *spa* t002. Os resultados demonstram uma origem comum, onde os isolados sofreram mutações em genes específicos que conseqüentemente levaram a uma mudança no ST, porém todas fazem parte do mesmo complexo clonal 5. Hudson et al.<sup>68</sup> realizaram tipagem molecular de isolados MRSA provenientes de idosos de 26 casas de repouso da Califórnia, e relataram que dentre os diferentes tipos de STs encontrados 64% pertenciam ao CC5 e que o *spa type* t002 foi o terceiro mais frequente, demonstrando uma disseminação mundial desses isolados.

O ST1176 foi descrito pela primeira vez por Carmo et al.<sup>69</sup> em isolados de pacientes do Hospital São Paulo e posteriormente por Pires<sup>70</sup> em indivíduos saudáveis do município de

Botucatu. O fato de este clone ter sido identificado em diferentes indivíduos em cidades distintas sugere ampla disseminação do clone no Estado de São Paulo. Também é importante destacar que o ST2594 foi relatado pela primeira vez por Pires<sup>70</sup>, isolado de *swab* nasal de portador saudável em estudo de base populacional na cidade de Botucatu.

Tavares et al.<sup>71</sup> realizaram estudos sobre epidemiologia de MSSA através da análise da evolução da população de *S. aureus* durante 19 anos em Portugal. Os resultados demonstraram que o ST5 (t002) foi o segundo tipo mais encontrado no estudo. Com base nesses resultados, é importante ressaltar que nosso estudo no CR também apresentou ST5 (t002), além de todas as origens apresentarem o *spa type* t002. Além disso, em uma das ILPs um isolado de MSSA revelou-se com o mesmo *spa type* (t002) dos isolados resistentes, demonstrando a relação evolutiva entre eles.

É importante ressaltar que com exceção do ST2599 que é um *double-locus variant* (DLV), ou seja, varia em dois *locus* do ST5, todos STs encontrados no estudo são *single-locus variant* (SLV) do ST5 ou seja, variam em apenas um *locus* do genótipo ancestral ST5. Esta prevalência do ST5 entre pacientes em diferentes áreas geográficas sugere que esta cepa pode ter características genéticas que facilitem a disseminação na comunidade, confirmando que é um das principais linhagens epidêmicas mundiais.

Desde a descoberta das técnicas de tipagem baseadas na sequência de DNA, numerosos estudos têm utilizado a técnica provando ser adequada e útil em aplicações epidemiológicas a curto prazo e a longo prazo. Além disso, a tipagem de isolados de MRSA e MSSA por MLST e *spa typing* é necessária para a elucidação da origem evolutiva desses microrganismos e possíveis vias de transmissão, controle e tratamento. Grundmann et al.<sup>60</sup> descrevem que existe uma ampla distribuição geográfica entre determinados *spa types* e que a distância média entre onde estão localizados esses *spa types* foi menor para os isolados de MRSA que MSSA, o que sugere um maior grau de aglomeração geográfica entre MRSA e um

maior poder de disseminação entre MSSA. Além disso, a diversidade genética foi muito menor para MRSA quando comparado ao MSSA. Com isso, relatam em seu estudo que pouco se sabe sobre a estrutura da população e abundância geográfica de MSSA, que é o reservatório genético a partir do qual emerge o MRSA.

O estudo ressalta a importância de relatar as taxas de colonização por *S. aureus* fora do ambiente tradicional de cuidados à saúde, com uma prevalência elevada associada a diversos fatores de virulência, agindo como um potencial reservatório de infecções por MRSA tanto nos ambientes estudados, quanto para a comunidade aberta. A pesquisa ilustra a necessidade de uma investigação mais profunda sobre estratégias eficazes de prevenção e intervenções apropriadas em ambulatórios, ILPs e prisões para minimizar a transmissão entre eles.

## 6. Conclusão

- Prevalência significativa de diversos genes de virulência entre isolados de MRSA e MSSA provenientes de diferentes origens, ressaltando a importância de MSSA.
- Predomínio de *S. aureus* com SCCmec Tipo IV no Centro de Ressocialização e *S. aureus* com SCCmec Tipo IV e SCCmec Tipo II em pacientes da Dermatologia e idosos das ILPs.
- Cepas virulentas e com altos níveis de resistência à oxacilina e outros antimicrobianos em MRSA SCCmec Tipo II, sendo encontradas principalmente na interface comunidade e hospital.
- MRSA com SCCmec IV no Centro de Ressocialização, ILPs e Dermatologia virulentas, porém sensíveis a outras classes de antimicrobianos.
- Intensa disseminação de MSSA e MRSA nos três ambientes estudados e a necessidade de melhores medidas de controle para evitar infecções decorrentes da colonização assintomática.
- Existência de um complexo clonal (CC5) disseminado nas três cidades do interior de São Paulo (Avaré, Botucatu e Bauru), que reforça a necessidade de um melhor direcionamento para a implantação de novas medidas de prevenção de disseminação de *S. aureus* nesses ambientes.

---

## Referências

1. Li M, Du X, Villaruz A, Diep BA, Wang D, Song Y et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med.* 2012; 18(5):816-819.
2. Adhikari RP, Ajao AO, Aman MJ, et al. Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections. *JID.* 2012; 206:915–23.
3. Otto, M. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64:143–62.
4. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med.* 2007;43(6):413-423.
5. Mediavilla, JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirthet BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol.* 2012;15:588-95.
6. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Br Med Bull.* 2010; 94: 215-227.
7. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. *Morb Mortal. Wkly Rep.* 2002;51:565–567.
8. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among competitive sports participants-Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles County, 2000-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003;52(33):793-5.
9. Cohen P. Cutaneous community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in participants of athletic activities. *South Med J.*2005;98(6)506-602.
10. Eckmann C, Dryden M. Treatment of complicated skin and soft-tissue infections caused by resistant bacteria: value of linezolid, tigecycline, daptomycin and vancomycin. *Eur J Med Res.* 2010;15:554-63.
11. Pfungsten-Würzburg S, Pieper DH, Bautsch W, Probst-Kepper M. Prevalence and molecular epidemiology of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in nursing home residents in northern Germany. *J Hosp Infect.* 2011;78:108-12.
12. Horner C, Parnell P, Hall D, Kearns A, Heritage J, Wilcox M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in elderly residents of care homes: colonization rates and molecular epidemiology. *J Hosp Infect.* 2013;83(3):212-8.

13. Malachowa N, Kobayashi SD, DeLeo F. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Athletes. *Physician Sports med.* 2012;40(2):1-8.
14. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *J Patho.* 2011;1:1-13.
15. Xu SX , McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *FCIMB.* 2012;2(52):1-11.
16. Brown ML, O'Hara P, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA et al. Prevalence and sequence variation of Panton-Valentine Leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States. *J Clin Microbiol.* 2012;50(1):86-90.
17. Szczuka E, Urbńska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol.* 2013; 1:1-6.
18. Katayama Y, Zhang Z, Chambers F. PBP 2a Mutations Producing Very High-Level Resistance to Beta-Lactams. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 2004;48:453-9.
19. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M et al. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE.* 2011;6(4):1793-6.
20. IWG-SCC. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome element. Acesso em 30 ago 2013. Disponível em: [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html)
21. Agius P, Kreiswirth B, Naidich S, Bennett K. Typing *Staphylococcus aureus* using the spa gene and novel distance measures. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2007;4(4):693-704
22. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(11):5113-20.
23. Perez-Losada M, Porter ML, Viscidi RP, Crandall KA. Multilocus Sequence Typing of Pathogens. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases.* 2011:503-21.
24. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5442-8.
25. Mellmann A, Friedrich AW, Rosenko N, Rothganger J, Karch H, Reintjes R et al. Automated DNA Sequence-Based Early Warning System for the Detection of

- Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks. PLoS Medicine. 2006; 3(3):348-55.
26. Konemman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5° ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
  27. Cunha MeL, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(8):855-60.
  28. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3332-8.
  29. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1998;36(3):618-23.
  30. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition (M02-A10). CLSI, 2012.
  31. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991;29:2240-4.
  32. Oliveira DC, 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.
  33. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:3374-7.
  34. Marconi C, Cunha MLRS, Araujo Jr JP, Rugolo LMSS. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus spp*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2004;11:117-28.
  35. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RA, Araújo JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. Braz J Micr. 2006;37:64-69.
  36. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29: 426-30.
  37. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Pantón-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. Emerg Infect Dis. 2007;13(4):594-600.

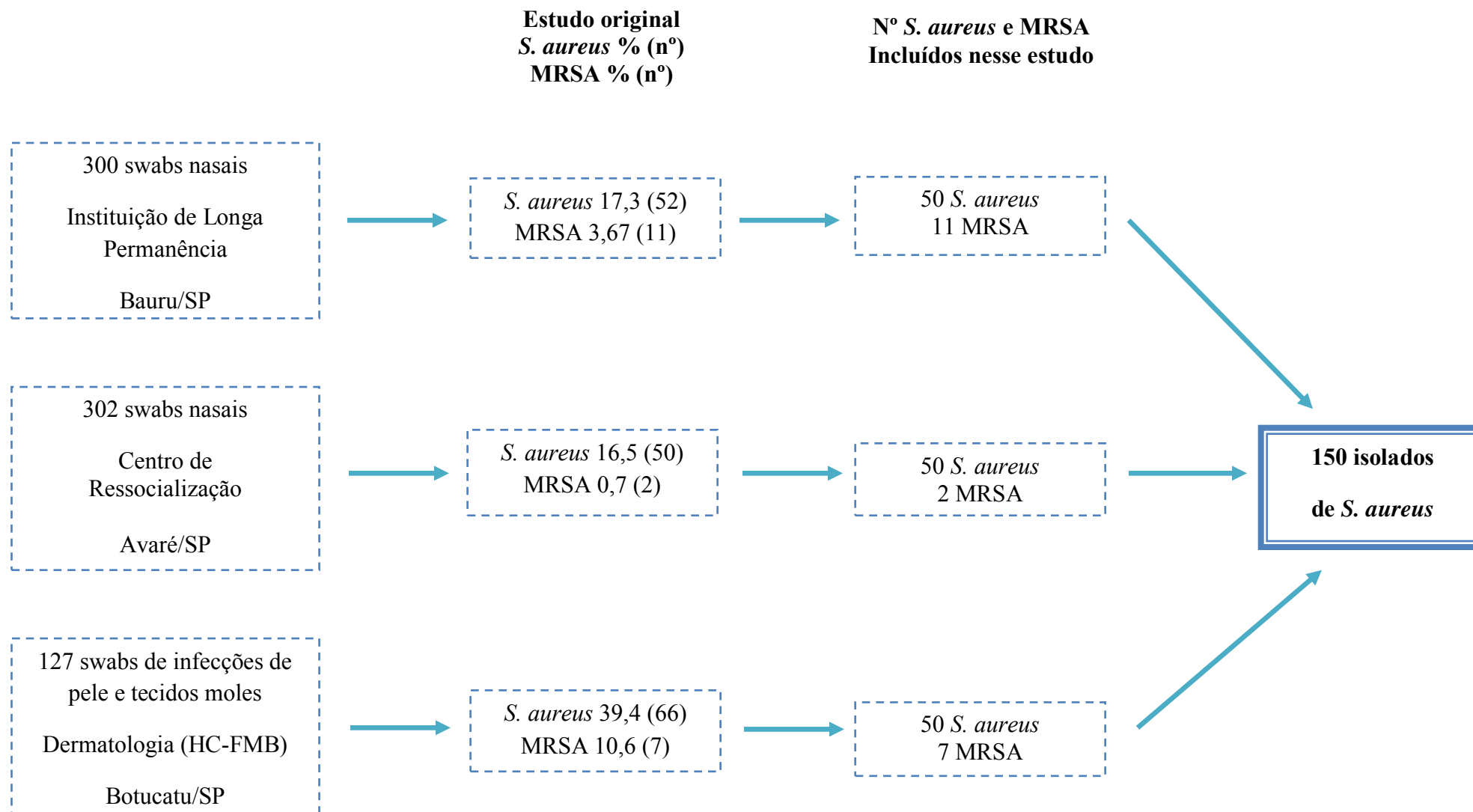
38. Koning S, Van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen, J, et al. Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Panton Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid psk41. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:3017-21.
39. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2151-6.
40. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1008-15.
41. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3556-63.
42. Gordon CP, Williams P, Chan WC. Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence Gene Regulation: A Medicinal Chemistry Perspective. *ACS.* 2012; 56(4):1389-404.
43. Chambers HF; DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature.* 2009; 7:629-41.
44. Maree, CL, Eells SJ, Tan J, Bancroft EA, Malek M, Harawa NT et al. Risk Factors for Infection and Colonization with Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Los Angeles County Jail: A Case-Control Study. *CID.* 2010;51(11):1248-57.
45. Denis O, Jans B, Deplano A, Nonhoff C, Ryck R, Suetens C et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among residents of nursing homes in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;64:1299-1306.
46. McDanel JS, Murphy CR, Diekema DJ, Quan V, Kim DS, Peterson EM et al. Chlorhexidine and Mupirocin Susceptibilities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Colonized Nursing Home Residents. *AAC.* 2013;57(1):552-8.
47. Lowy FD, Aiello AE, Bhat M, Johnson-Lawrence VD, Lee M, Burrell E et al. *Staphylococcus aureus* Colonization and Infection in New York State Prisons. *JID.* 2007;196:911-8.
48. Miller LG, Eells SJ, Taylor AR, David MZ, Ortiz N, Zychowski D et al. *Staphylococcus aureus* Colonization Among Household Contacts of Patients With Skin Infections: Risk Factors, Strain Discordance, and Complex Ecology. 2012; 54(11):1523-35.
49. Boyle-Vavra, S.; Daum R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidina. *Lab invest.* 2007;87(1):3-9.



50. Chen F, Huang I, Wang C, Chen P, Wang H, Lai J et al. *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1679-83
51. Ghaznavi-Rad E, Shamsudin MN, Sekawi Z, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA et al. Predominance and Emergence of Clones of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *JCM.* 2010;48(3):867–72.
52. Jekle A et al. NVC-422 Inactivates *Staphylococcus aureus* toxins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):924–9.
53. Karauzum H, Chen G, Abaandou L, Mahmoudieh M, Boroun AR, Shulenin S et al. Synthetic human monoclonal antibodies towards staphylococcal enterotoxin B (SEB) protective against toxic shock syndrome. *J Biol Chem.* 2012;287:25203-15.
54. Lim KT, Hanifah YA, Yusof M, Thong KL. Investigation of toxin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Trop. Biomed.* 2012;29(2):212–9.
55. Katayama Y, Baba T, Sekine M, Fukuda M, Hiramatsu K. Beta-hemolysin promotes skin colonization of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2013;195(6):1194-203.
56. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Hechard Y. Gama-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides.* 2009;30:817–23.
57. Lo CW, Lai YK, Liu YT, Gallo RL, Huang CM. *Staphylococcus aureus* hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting  $\beta$ -hemolysin and CAMP factor. *J Invest Dermatol.* 2011;131(2):401–9.
58. Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Microbiol Immunol.* 2008;322:207–28.
59. Diamond-Hernández B, Santos FS, Miranda BL, Peregrino-Bejarano L, Novales GM. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infect Dis.* 2010;10:68.
60. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW et al. Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *PLoS Medicine.* 2010; 7(1):1-15.
61. Karauzum H et al. Comparison of adhesion and virulence of two predominant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones and clonal methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;76(11):5133–8.
62. Basset P, Nübel U, Witte W, Blanc DS. Evaluation of Adding a Second Marker To Overcome *Staphylococcus aureus* spa Typing Homoplasies. *JCM,* 2012;50(4):1475-7.

63. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Blanco MG, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis.* 2010;14(7):560-6.
64. Pacheco RL, Lobo RD, Oliveira MS, Farina EF, Santos CR, Costa SF et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in a dermatology unit. *CLINICS* 2011;66(12):2071-7.
65. Blanc DS, Petignat C, Wenger A, Kuhn G, Vallet Y, Fracheboud D et al. Changing Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Small Geographic Area over an Eight-Year Period. *JCM.* 2007; 45(11):3729–36.
66. Chung M, Dickinson G, Lencastre H, Tomas A. International Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Hospitals in Miami, Florida. *JCM.* 2004; 42(2):542–7.
67. Gardella N, Murzicato S, DiGregorio S, Cuirolo A, Dese J, Crudo F et al. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1066-71.
68. Hudson LO, Reynolds C, Spratt BG, Enright MC, Quan V, Kim D et al. Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Residents of 26 Nursing Homes in Orange County, California. *JCM.* 2013;51(11);3788–95.
69. Carmo MS, Inoue F, Andrade SS, Paschoal L, Silva FM, Oliveira FGS et al. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol.* 2011;44(10):1013-7.
70. Pires FV. Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2012.
71. Tavares A, Faria NA, Lencastre H, Miragaia M. Population structure of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) in Portugal over a 19-year period (1992–2011). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013:1-10.

ANEXO A. Fluxograma da prevalência de *Staphylococcus aureus* isoladas nos estudos originais e das amostras incluídas nesse estudo.



## ANEXO B. Características das Instituições de Longa Permanência (ILPs)

ILPs	A	B	C	D	E	F	G
Nº de idosos	115	16	14	29	51	14	39
Nº de cuidadores	13	5	6	7	8	3	11
Leitos / Quartos	Até 4 leitos por quarto	Entre 2 a 3 leitos por quarto	8 quartos com 2 leitos, 1 com 3 leitos e 1 quarto com 4 leitos	15 quartos com 2 leitos e 2 quartos são individuais com apenas 1 leito	Entre 4, 3 e 2 leitos	1 quarto com 3 leitos, 1 com 4 leitos, e 2 quartos com 2 leitos	2 leitos por quarto
Nº de quartos	57	6	10	17	21	4	29
Visitas externas	Quinzenalmente	À vontade	À vontade	14 às 17 horas	À vontade	À vontade	14 às 16 horas diariamente
Profissionais da saúde	6 horas mensais (Clínico geral) e 2 horas semanais (Psiquiatra) Psicólogo, fisioterapeuta e nutricionista.	Quando necessário	Médico a cada 15 dias Fisioterapeuta diariamente	Quando necessário	Infectologista 1 vez por semana Fisioterapeuta 3 vezes por semana	Visita média 2 vezes ao mês Fisioterapeuta 3 vezes por semana	Médico vascular quinzenalmente Estagiários em fisioterapia (semanal), psicólogos e assistentes sociais
Atividades comunitárias	Banho de sol, televisão, cinema, feira livre, bailes, festas de aniversário mensalmente, entre outras	Banho de sol e televisão	Banho de sol, televisão, atividades em grupo e/ou individuais com fisioterapeuta	Banho de sol e televisão.	Banho de sol, televisão, jogos e festas	Jogos, banhos de sol e televisão.	Banhos de sol, televisão, igreja interna, artesanato, teatro e musicais

## ANEXO C. Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 02 de julho de 2012

335/2012-CEP

Ilustríssima Senhora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha  
Departamento de Micro/Imuno do  
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezada Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 4273-2012**) "**Stapylococcus aureus: resistência aos antimicrobianos, virulência e tipagem molecular de MRSA pelas técnicas de MLST e spa typing**", a ser conduzido por Camila Sena Martins de Souza, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pelo Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02/07/2012.

**Situação do Projeto: APROVADO.** Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP