



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

Eliane Patricia Lino Pereira Franchi

**Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência  
de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados  
de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de  
saúde da cidade de Botucatu**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em  
Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**ELIANE PATRICIA LINO PEREIRA FRANCHI**

**“Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência de  
*Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes  
atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de  
Botucatu”**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
graduação em Doenças Tropicais da  
Faculdade de Medicina de Botucatu –  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho" (UNESP), para obtenção do  
título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**Botucatu**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Franchi, Eliane Patricia Lino Pereira.

Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu / Eliane Patricia Lino Pereira Franchi. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Capes: 21202010

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Tipagem molecular. 3. Prevalência. 4. Cuidados primários de saúde. 5. Epidemiologia.

Palavras-chave: Epidemiologia; *Staphylococcus aureus*; atenção primária; prevalência; tipagem.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Benedito e Sonia, que sempre incentivaram e acreditaram nos meus  
sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus pela vida e tudo que sou.*

*À Minha orientadora Maria de Lourdes por sempre acreditar e investir em mim, pela compreensão, amizade, supervisão, exemplo e todo conhecimento passado. Minha especial gratidão e admiração.*

*Aos meus amigos e companheiros do laboratório, que durante esses dez anos me ensinaram muito.*

*Em especial à Mariana, Katheryne, Lígia e Danilo, os quais os agradecimentos não caberiam em uma página. Obrigado por tudo.*

*Aos funcionários, professores e alunos do departamento de Microbiologia e Imunologia.*

*A Fapesp pelo auxílio financeiro prestado. Processos: 2011/10146-7, 2012/00257-9 e 2013/10975-9.*

*Ao Professor Carlos Magno pela colaboração e pelas análises estatísticas que muito contribuíram neste trabalho.*

*Ao professor Cassiano pela atenção e análises de georreferenciamento.*

*A Todos os funcionários das unidades de saúde de Botucatu que contribuíram para a realização deste estudo.*

*A todos os pacientes que participaram deste estudo.*

*Ao meu esposo Flávio, pelo amor, paciência, compreensão e apoio na busca de nossos sonhos.*

*Aos meus filhos, João Miguel e Liz, motivo de toda minha luta e razão do meu viver.*

*A toda a minha família pelo amor e incentivo concedidos. Em especial ao meu irmão Willian, Tia Célia, Tia Rosana, Mariana, vô Antenor, vó Aparecida (in memorian), Tio Nande (in memorian).*

*Ao Lucas e lara que sempre me ajudaram e acolheram nessas idas e vindas à Botucatu.*

*A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para concretização desse trabalho.*

*“The two most important days in your life are the day you are born and the day you find out why.”*

Mark Twain

## RESUMO

PEREIRA FRANCHI, E.P.L. Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu. 2016. 92 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Diante da importância de *S. aureus* resistente à meticilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) em feridas, este estudo objetivou estudar a prevalência, fatores de risco e epidemiologia molecular de *S. aureus* coletados de feridas e narinas de pacientes atendidos nas 17 Unidades Básicas de Saúde do município de Botucatu-SP, Brasil. Após a identificação dos isolados de *S. aureus*, foram realizados: teste de susceptibilidade à 13 drogas antimicrobianas, identificação do gene de resistência (*mecA*) e dos genes codificadores da Leucocidina PantónValentine- PVL (*pvl*), enterotoxinas A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, e *see*), hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  (*hla*, *hlb* e *hld*), esfoliatinas A, B e D (*eta*, *etb* e *etd*), biofilme (*icaAD*) e Toxina-1 da Síndrome do choque tóxico – TSST-1 (*ts1*); tipagem molecular por *Pulsed-Field Gel Eletroforese* (PFGE), *Multilocus sequence typing* (MLST) e *spa* typing. Foram incluídos 171 pacientes, dos quais foram isolados 119 *S. aureus*. Amostras nasais foram coletadas apenas em 74 pacientes do total estudado. A prevalência de *S. aureus* e MRSA foi de 51,5% e 8,7%, respectivamente. No geral foram isolados 101 MSSA de 73 pacientes, destes 98 foram isolados de feridas e 21 de narinas; e 18 MRSA de 15 pacientes, sendo 4 isolados de narinas e 14 de feridas, com 6 MRSA com SCC*mec* tipo II e 12 com SCC*mec* tipo IV. Os isolados mostraram alto nível de resistência a penicilina (85%), seguido pela eritromicina (27%), gentamicina (12%), clindamicina (11%), e levofloxacina (6%). Não houve resistência ao sulfametoxazol/trimetoprim, ácido fusídico, tigeciclina, quinupristina/dalfopristina e linezolida. A pesquisa por genes de virulência nos 119 isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes demonstrou que 42% possuem genes para enterotoxina A, 11% para enterotoxina B, 26% para enterotoxina C e 0,8% para enterotoxina D, 100% para o gene *icaA*, 95,8% para o

gene *icaD*, 97,5% para o gene da hemolisina alfa, 65% para hemolisina beta, 95% para hemolisina delta, 4,2% para TSST-1 e 2,5% para o gene da PVL. Houve associação entre a presença de *S. aureus* nas narinas e nas feridas ( $p < 0,01$ ), o mesmo ocorreu para MRSA ( $p < 0,01$ ). A análise multivariada para *S. aureus*, demonstrou associação negativa com idade (OR: 0,94, IC95%: 0,90-0,98,  $p < 0,01$ ), uso de amoxicilina (OR: 0,16, IC95%: 0,04-0,60,  $p < 0,01$ ) e de ciprofloxacina (OR: 0,28, IC95%: 0,08-0,98,  $p = 0,04$ ). Por outro lado, observou-se associação positiva com uso de benzilpenicilina (OR: 3,81, IC95%: 1,23-11,82,  $p = 0,02$ ). Houve a formação de oito clusters, com predominância de MSSA que apresentaram as STs: 5, 30, 188, 1635 e spa t002. Os 18 MRSA foram caracterizados pelos STs: 5, 8 e 1176 e pelos spas t002, t008 e t062. Foram isoladas linhagens semelhantes aos clones internacionais USA300, USA500 e USA800. Nossos resultados demonstram a presença de clones importantes de MRSA resistentes e virulentos em pacientes atendidos nas diferentes UBSs estudadas.

**Palavras-chave:** *S. aureus*, MRSA, Prevalência, Epidemiologia; Tipagem; Atenção primária.

## ABSTRACT

PEREIRA FRANCHI, E.P.L. Molecular epidemiology and study of virulence factors of *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin isolated from wounds in patients treated in basic health units in the city of Botucatu. 2016. 92 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Given the importance of methicillin resistant *S. aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) and wounds, this study aimed to study the prevalence, risk factors and molecular epidemiology related to the presence of *S. aureus* sensitive and resistant to methicillin in wounds of patients who attended BHUs in a city in Sao Paulo state, Brazil. After the identification of *S. aureus* isolates was performed: susceptibility testing to 13 antimicrobial drugs, identification of the resistance gene (*mecA*) and the genes encoding Panton-Valentine Leukocidin - PVL (*pvf*), enterotoxins AE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) hemolysins  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  (*hla*, *hlb* and *hld*), esfoliatinas A, B and D (*eta*, *etb* and *etd*), biofilm (*icaAD*) and Toxin-1 syndrome of toxic shock - TSST-1 (*tst*); Molecular typing by Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE), *multilocus sequence typing* (MLST) and *spa* typing. 171 patients were included and 119 *S. aureus* isolates. Nasal samples were collected only in 74 patients of the total sample. The prevalence of *S. aureus* and MRSA was 51.5% and 8.7%, respectively. Overall 101 MSSA were isolated from 73 patients, 98 of these were isolated from wounds and 21 nostrils; MRSA and 18 of 15 patients, 4 isolates from nostrils and 14 wounds, with six MRSA with SCC*mec* type II and 12 SCC*mec* type IV. The strains showed high-level resistance to penicillin (85%) followed by erythromycin (27%), gentamicin (12%), clindamycin (11%) and levofloxacin (6%). There was no resistance to sulfamethoxazole / trimethoprim, fusidic acid, tigecycline, quinupristin / dalfopristin and linezolid. The search for virulence genes in the 119 isolates of *S. aureus* sensitive and resistant, 42% demonstrated presence of genes *sea*, 11% to *seb*, 26% to *sec*, 0.8% to *sed*, 100% to *icaA*, 95.8% *icaD*, 97.5% to *hla*, 65% to *hlb*, 95% to *hld*, 4.2% to *tst* and 2.5% to *pvf*. There was an association between the presence of *S. aureus* in the nostrils to the wounds ( $p < 0.01$ ), the same was true for MRSA ( $p < 0.01$ ). Multivariate analysis for *S. aureus*, showed a negative association with age (OR: 0.94, 95% CI: 0.90-0.98,  $p < 0.01$ ),

use of amoxicillin (OR: 0.16, 95% CI: 0.04-0.60,  $p < 0.01$ ) and ciprofloxacin (OR: 0.28, 95% CI: 0.08-0.98,  $p = 0.04$ ). On the other hand, there was a positive association with use of penicillin G (OR: 3.81, 95% CI: 1.23-11.82,  $p = 0.02$ ). There was the formation of eight clusters, with a predominance of MSSA presenting the STs: 5, 30, 188, 1635 and spa t002. The 18 MRSA were characterized by STs 5, 8 and spas 1176 and the t002, t008 and t062. Strains were isolated similar to international clones USA300, USA500 and USA800. Our results demonstrate the presence of important clones resistant and virulent MRSA patients studied in different UBS.

**Keywords:** *S. aureus*, MRSA, Prevalence, Epidemiology; Typing; Primary attention.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo 1

**Figure 1:** Flowchart showing the number of nasal and wound *S. aureus* isolates.....44

### Artigo 2

**Figura 1:** Formação de clusters usando isolados de pacientes em que foram coletadas amostras em dois ou três momentos da pesquisa.....75

**Figura 2:** Distribuição espacial aferida pela aplicação do estimador Kernel .....76

**Figura 3:** Residência dos pacientes com MRSA em ferida e/ou nariz.....76

**Figura 4:** Principais STs identificados nos pacientes com *S. aureus* .....77

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

**Table 1:** Univariate and multivariate analysis of risk factors for carriage of *Staphylococcus aureus* and MRSA in patients attended at basic health units of the city of Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.....57

**Table 2:** Characterization of MRSA isolates from patients attended at basic health units (BHUs) of the city of Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.....59

### Artigo 2

**Tabela 1:** Principais agrupamentos e características dos isolados de *S. aureus* tipados pelo PFGE, tipo de ST, spa, SCC*mec*, genes de virulência e UBS de origem.....68

**Tabela 2:** Caracterização dos isolados de MRSA: tipo de SCC*mec*, PFGE, MLST, spa, origem e UBS.....71

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 Problemática	15
1.2 As feridas	15
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.4 As Unidades Básicas de Saúde	25
1.5 Justificativa	26
<b>2 REFERENCIAS</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivos Gerais	34
3.2 Objetivos específicos	34
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1 Artigo 1	36
4.2 Artigo 2	60
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>90</b>
<b>6 ANEXOS</b>	<b>92</b>
6.1 Questionário	92
6.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95
6.3 Comprovantes Comitê de Ética	97

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Problemática*

São escassos estudos que avaliam a presença, fatores de risco e epidemiologia de *Staphylococcus aureus* em feridas e em locais de atenção primária em saúde.

### 1.2 *As feridas*

No Brasil, as feridas acometem a população de forma geral, independente de sexo, idade ou etnia, determinando um alto índice de pessoas com alterações na integridade da pele, constituindo assim, um sério problema de saúde pública. Porém, não há dados estatísticos que comprovem este fato, devido a falta de registros desses atendimentos (Brasil, 2002).

As feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. Agudas são aquelas resultantes de cirurgias e traumas, que geralmente cicatrizam dentro de um prazo previsível (Sibbald et al., 2003). Ainda não há concordância na definição de ferida crônica. Alguns definem ferida crônica quando não cicatrizam no período de 4 a 6 semanas (Fowler, 1990; Singh et al., 2004). Independente do tempo levado para cura da ferida é considerada ferida crônica quando há falha no processo de cicatrização. Os principais tipos de feridas crônicas são: úlceras venosas, úlceras arteriais, pé diabético e úlceras de pressão.

A infecção e colonização dessas lesões são a principal causa de não cura e cronicidade, sendo *Staphylococcus aureus* o agente mais

frequentemente isolado (Vandenesch; Etienne, 2004; Gjødsbøl et al., 2006; Bessa et al., 2015). A situação se agrava com o aumento da incidência de *S. aureus* metilina resistentes (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA).

Independente de colonização ou infecção, ambos tem implicações danosas ao processo de cura das feridas, dentre estas a bacteremia causada por MRSA (Roghmann et al., 2001; Bang et al., 2004). Pirett et al. (2012) realizaram estudos em pacientes com úlceras de pressão, 13/145 (9%) estavam colonizadas e 50/145 (34%) infectadas com MRSA, sendo que 1/13 (8%) das feridas infectadas e 11/22 (22%) das colonizadas desenvolveram bacteremia.

Pessoas com feridas colonizadas por MRSA podem servir de reservatório e transmiti-lo para outros indivíduos, sendo importante trata-los, entretanto não há conhecimento de um bom antibiótico para esse fim (Gurasamy et al., 2013).

Apesar da gravidade do problema, Gurasamy et al. (2013) encontraram apenas três estudos clínicos randomizados em uma revisão que objetivava estudar os benefícios (como diminuição da mortalidade e aumento da qualidade de vida) e malefícios (como efeitos adversos) do tratamento antibiótico em pessoas com feridas não cirúrgicas com colonização ou infecção por MRSA. Entretanto, nenhum deles comparou o uso de antibiótico com o não uso, para tratamento de feridas colonizadas.

### 1.3 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma importante bactéria envolvida em infecções adquiridas tanto na comunidade como em hospitais, sobressaindo-se atualmente como um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções nosocomiais. Destaca-se por sua patogenicidade e alta frequência, permitindo que este agente seja capaz de produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em sadios por sua fácil disseminação intra-hospitalar e sua enorme capacidade de adaptação e resistência a antibióticos (Enright et al., 2002).

*Staphylococcus* spp. são usualmente comensais das fossas nasais, pele e até intestinos de indivíduos sãos. Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais. Por isso, as infecções frequentemente resultam da introdução dessas cepas em locais previamente estéreis após um trauma, abrasões de pele e mucosas ou durante procedimentos cirúrgicos (Verhoeven et al., 2014).

Ao carregar a bactéria potencialmente infectante em sua microbiota, o indivíduo pode comportar-se de duas maneiras fundamentais: desenvolvendo o quadro clínico de infecção com os sinais e sintomas característicos, ou então como, assintomáticos, também conhecidos como portadores sãos, e destituídos de sintomatologia, apesar de estarem colonizados. 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. Assim, principalmente em hospitais, o hospedeiro assintomático pode ser um paciente, um visitante, ou mesmo um profissional de saúde (Verhoeven et al., 2014).

A descoberta dos antimicrobianos no passado produziu uma acentuada redução na mortalidade por inúmeras doenças infecciosas. A administração dos antibióticos à população humana e seu uso com outras finalidades propiciam a seleção de micro-organismos resistentes, assim muitos antibióticos perderam e ainda perdem sua eficácia.

A introdução da meticilina e análogos (oxacilina, dicloxacilina) foi logo seguida pelo aparecimento de cepas de MRSA já na década de 60 (Chambers, 1988). Contudo, a maior frequência de relatos de MRSA como patógeno em infecções hospitalares deu-se a partir do início dos anos 80, sendo responsável atualmente por níveis endêmicos significativos em muitas instituições, quando não epidêmicos.

A vancomicina é considerada a droga de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas graves, especialmente as causadas por MRSA. Entretanto em 1997 foi descrito, pelo Professor Keich Hiramatsu, da Universidade de Jutendo, Japão, um caso de uma cepa com resistência intermediária à vancomicina (Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* – VISA) isolada de uma ferida cirúrgica de um garoto de 4 meses (Hiramatsu et al., 1997). Em 2002 foi encontrado, nos EUA, o primeiro isolado clínico de cepa

VRSA (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - VRSA) e até maio de 2015 foram descritos 14 cepas de VRSA causando infecções em pacientes nos Estados Unidos (Walters et al., 2015). No Brasil, o primeiro relato de VRSA ocorreu recentemente em um paciente com infecção da corrente sanguínea causada por um MRSA que era susceptível a vancomicina, mas que adquiriu o gene *vanA* durante a terapia antibiótica e tornou-se resistente à vancomicina (Rossi et al., 2014).

A marcante capacidade dos MRSA em adquirir genes de resistência a antimicrobianos dificulta cada dia mais o tratamento das infecções causadas por esse patógeno. A alta mortalidade e morbidade ocasionada por esse agente associada aos altos custos financeiros, a falta de investimentos e a falta de sucesso na produção de novos fármacos antimicrobianos pela indústria farmacêutica, junto à obsolescência intrínseca por resistência são fatores importantes que impedem o tratamento (Overbye et al., 2005).

Os estafilococos exibem sensibilidade variável a muitos agentes antimicrobianos. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode ser dividida em várias categorias, sendo as duas principais: (1) a produção de  $\beta$ -lactamase, codificada por genes plasmidiais, é comum e torna os micro-organismos resistentes a classe das penicilinas (penicilina G, ampicilina, ticarcilina e fármacos semelhantes). Os plasmídios são transmitidos por transdução e provável conjugação (Jawetz et al., 2000) (2) A resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp. é primariamente mediada pelo gene *mecA*, que codifica

uma proteína que apresenta afinidade reduzida por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicillin-binding protein 2a – PBP2a) (Warren et al., 2004).

O alvo de atuação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são as chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP's), proteínas de membrana diretamente envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana. Os  $\beta$ -lactâmicos, que interagem com as PBP's, impedem a formação completa da camada de peptidoglicano da parede celular, 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 PBP2a que apresenta baixa afinidade aos  $\beta$ -lactâmicos. Portanto, no isolado resistente à oxacilina (MRSA) não ocorrerá inibição da síntese da parede bacteriana, uma vez que a PBP2a funciona como uma PBP substituta (Chambers et al., 1988; Boyle-Vavra et al., 2003; Katayama et al., 2004).

Nas últimas décadas, *S. aureus* resistente à meticilina emergiram na comunidade (CA-MRSA, Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). O CA-MRSA é um patógeno emergente que vem apresentando frequência crescente de isolados. Os pacientes acometidos por CA-MRSA não tiveram internação em hospitais no ano anterior à infecção, nem foram submetidos a procedimentos médicos como diálise, cirurgia ou cateter, fatos muito comuns em infecção por MRSA (Bratu et al., 2006).

Enquanto o MRSA hospitalar (HA-MRSA, Hospital-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) se caracteriza por uma ampla resistência a

diversos antibióticos, as cepas CA-MRSA mostram uma sensibilidade (entre 85% e 100%) a drogas como clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametaxazol/trimetoprim e vancomicina, mostrando-se resistente apenas à oxacilina e a outros beta-lactâmicos (Ribeiro et al., 2005).

A diferença entre os perfis de resistência das cepas HA-MRSA e CA-MRSA parece ser explicado pelo tamanho e distribuição dos cassetes cromossômicos (*SCC<sub>mec</sub>*) que possuem o determinante de resistência à oxacilina. Entre os principais tipos de *SCC<sub>mec</sub>* (I, II, III, IV e V), os tipos I, II e III foram historicamente denominados de cepas HA-MRSA, enquanto que os tipos IV e V foram associados a cepas de CA-MRSA, nas quais o tipo IV tem menor tamanho, com genes de resistência somente para os  $\beta$ -lactâmicos (Ribeiro et al., 2005). Entretanto, pode ser verificada no CA-MRSA a produção de até 18 toxinas menos frequentes no MRSA hospitalar, incluindo a Leucocidina Panton-Valentine (PVL), enterotoxina H e múltiplos superantígenos.

Os CA-MRSA Panton-Valentine positivos são facilmente transmitidos não somente entre familiares, mas também em grande escala na comunidade, como prisões, escolas e times de esportes. O contato pele-pele envolvendo abrasões e contato indireto com objetos contaminados como toalhas, lençóis, equipamentos de esportes parecem representar um modo de transmissão. Atualmente essa denominação CA e HA-MRSA está perdendo o sentido justamente pela presença de cepas antes consideradas comunitárias dentro dos hospitais e em pacientes com fatores de risco (Vandenesch; Etienne, 2004).

Não menos importante do que a resistência dos *S. aureus* aos antimicrobianos são os fatores de virulência, que agravam o quadro de infecção tornando o *S. aureus* altamente patogênico e virulento. Dentre os fatores de virulência mais importantes estão: (1) a presença de enterotoxinas, principal causa de intoxicações alimentares de origem bacteriana (Argudín et al., 2010); (2) a Leucocidona Pantón Valentine (PVL), uma citotoxina capaz de induzir a destruição de leucócitos humanos e causar grande dano tecidual, associada a infecções de pele primárias severas e pneumonias necrotizantes (Vandenesch et al., 2012); (3) a Toxina 1 da Síndrome do Choque tóxico (TSST-1) caracterizada por febre alta, rash eritematoso, hipotensão, hipoalbuminemia e envolvimento de 3 ou mais órgãos (Bukowski et al., 2010); as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\delta$ , auxiliam no poder invasivo da bactéria, destaca-se a alfa-toxina responsável pela lise de eritrócitos (Vandenesch et al., 2012); as esfoliatinas A, B e C, que causam a descamação da pele, também chamada de Síndrome da pele escaldada (Bukowski et al., 2010); e o biofilme que pode ser definido como uma comunidade de células microbianas que estão fixadas a uma superfície ou a outras células, e envoltas por uma protetora matrix extracelular (Lister, 2014).

A emergência e disseminação de cepas de MRSA nos hospitais e na comunidade requerem atenção das comissões de controle de infecção, sendo a tipagem molecular uma importante ferramenta de medida, assim como de estudo da origem, ligação clonal e epidemiologia de surtos de *S. aureus*. Atualmente, o uso de técnicas de biologia molecular para caracterização e

identificação de genes de resistência e virulência tornou-se indispensável. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada, com destaque para a PCR em tempo real, devido às excelentes sensibilidade e especificidade, possibilidade de quantificação, economia de tempo, trabalho e custos, uma vez que não há necessidade do processamento da amostra após o término do ciclo e baixo risco de contaminação biológica/química, devido a não manipulação de produtos amplificados (Espy et al., 2006).

Embora recentemente estejam disponíveis diferentes métodos moleculares de diferenciação de cepas de *S. aureus*, nenhuma é claramente superior em todas as condições. Técnicas de tipagem molecular como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e detecção de SCC*mec* são úteis na identificação de cepas correlacionadas (Espy et al., 2006).

Atualmente, PFGE é o método de tipagem molecular mais utilizado para o estudo epidemiológico de MRSA. Embora o PFGE tenha excelente poder discriminatório, ele exige labor intenso, custo elevado de análise e como todos métodos que dependem de comparações de padrões de fragmentos em gel, existe a dificuldade em se comparar os resultados de laboratórios diferentes (Tenover et al., 1994; Van Belkum et al., 1998). Dessa forma, existe uma grande confusão sobre a relação genética dos clones de MRSA descritos por diferentes laboratórios, havendo a necessidade de um método confiável que permita

identificar clones de MRSA e clones virulentos de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina (MSSA) (Enright et al., 2000).

O sequenciamento de DNA é uma alternativa para tipagem de *S. aureus*, tendo como vantagem a clara interpretação de dados e simplicidade na criação de bancos de dados e excelente comparabilidade dos resultados, como descrito com o MLST (Aires de Sousa et al., 2006).

O MLST é um método de tipagem molecular que caracteriza isolados com base em seqüências de 450-bp de fragmentos internos de sete genes essenciais. Para cada fragmento do gene, as seqüências diferentes são atribuídas como alelos distintos, e cada isolado é definido pelos alelos em cada um dos sete locus essenciais (o perfil alélico ou tipo de seqüência- ST). Como existem muitos alelos em cada um dos sete locus, é improvável que os isolados tenham perfis alélicos idênticos por acaso, e os isolados com mesmo perfil alélico podem ser designados como membros do mesmo clone (Maiden et al., 1998; Spratt et al., 1999). Os dados da seqüência são facilmente comparados entre laboratórios, e uma grande vantagem do MLST é a capacidade de comparar os resultados obtidos em diferentes estudos através da Internet. Entretanto, alguns estudos mostram que o MLST não é apropriado para a rotina de controle de infecção, por seu alto custo, trabalho intenso e baixo poder discriminatório comparado com o PFGE (Aires de Sousa et al., 2006).

Outro método de tipagem muito utilizado é o *spa* typing, que usa seqüências da região polimórfica X ou seqüência curta de repetições (SSR) do

gene da proteína A (*spa*) de *S. aureus*. A região polimórfica X consiste de um número variável de repetições de 24 pares de base situado imediatamente à montante da região codificadora da parede da bactéria anexo a sequência C-Terminal (Guss et al., 1984). A diversidade da região SSR parece surgir da deleção e duplicação de repetitivas unidades e também por pontos de mutação (Brigido et al., 1991). Pode ser atribuído a diferentes repetições um código alfa numérico, definindo a ordem de específicas repetições como tipos de *spa*. O algoritmo BURP (Based Upon Repeat Pattern) permite a classificação dos tipos de sequencias (STs) dentro de diferentes grupos BURP (Harmsen et al., 2003).

A presença de regiões bem conservadas ladeando a região X permite o uso de iniciadores para a amplificação por PCR e tipagem da sequência. Essa técnica quando comparada ao MLST tem a vantagem de ser mais rápida e conveniente para investigação de surtos, pois utiliza apenas um único locus (Shopsin et al., 1999).

#### **1.4 As Unidades Básicas de Saúde**

A atenção primária à saúde (APS) é constituída pelas unidades básicas de saúde (UBSs), enquanto o nível intermediário de atenção fica a encargo do SAMU192 (Serviço de Atendimento Móvel de Urgência), Unidades de Pronto Atendimento (UPA) e ambulatórios, enquanto o atendimento de média e alta complexidade é feito nos hospitais. As UBSs atuam dentro desse contexto, realizando a assistência de uma população específica que está em um território

definido, assumindo a responsabilidade sanitária e o cuidado destas pessoas (Portal da Saúde).

A APS é oferecida basicamente em dois cenários: UBSs tradicionais e as Unidades com Estratégia da Saúde da Família (ESF). Independentemente da estratégia de sua organização, sua missão é desenvolver ações de promoção, prevenção e reabilitação da saúde, de modo a intervir no processo de saúde doença da população. As UBSs são a porta de entrada preferencial do SUS e têm o objetivo de atender até 80% dos problemas de saúde da população, sem que haja a necessidade de encaminhamento para hospitais.

Apesar do grande número de atendimentos realizados, praticamente não existem estudos sobre a prevalência e fatores de risco para a aquisição de microorganismos resistentes dentro desses locais. Diferentemente do que ocorre nos hospitais, a APS ainda carece de informações nesse sentido, o que se deve em grande parte à complexidade e dinâmica dos atendimentos realizados por esses serviços.

### 1.5 *Justificativa do estudo*

Este estudo se justifica mediante a importância de *S. aureus* como um dos micro-organismos mais frequentemente isolados em feridas (Gjødsbøl et al., 2006), associado ao grande número de pessoas acometidas por essas alterações de pele e a crescente disseminação de *S. aureus* resistentes à oxacilina (MRSA), o que

dificulta o tratamento, aumenta custos e causa grande preocupação. A realização desse estudo ajudará entender a dinâmica de transmissão de MRSA na atenção primária em saúde. Este nível de atenção à saúde é responsável por mais de 80% de toda assistência em saúde do país, sendo escasso o número de pesquisas nesse ambiente e com esse enfoque.

## 2. REFERENCIAS

Aires de Sousa M, Boye K, Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, et al. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence- based typing of bacteria in a multicenter study. **J Clin Microbiol** 2006; 44: 619–621.

Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins** 2010; 2:1751-1773; doi:10.3390/toxins2071751

Bang RL, Sharma PN, Sanyal SC, Bang S, Ebrahim MK. Burn septcaemia in Kuwait: associated demographic and clinical factors. **Medical Principles and Practice** 2004;13(3): 136-41.

Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. **Int Wound J** 2015; 12:47–52.

Boyle-Vavra S, Yin S, Challapalli M, Daum R. Transcriptional Induction of the Penicillin-Binding Protein 2 Gene in *Staphylococcus aureus* by Cell Wall-

- Active Antibiotics Oxacillin and Vancomycin. **Antimicrob Agent Chemother** 2003;47:1028-1036.
- Bratu S, David Landman D, Gupta J, Trehan M, Panwar M, Quale J. A population based study examining the emergence of community-associated methicillin resistant *S. aureus* USA300 in New York City. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 2006;5:29.
- Brigido MDM, Barardi CR, Bonjardin CA, Santos CL, Junqueira ML, Brentani RR. Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggest molecular heterogeneity among strains. **J Basic Microbiol** 1991; 31: 337-345.
- Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins** 2010; 2:1148-1165; doi:10.3390/toxins2051148.
- Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. **Clin Microbiol Rev** 1988; 1: 173-186.
- Enright MC, Day NPJ, 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): 1008–1015.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil E, Grundmann H, Spratt B. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS** 2002; 99:7687-7698.

Espy MJ, Uh JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clin Microbiol Rev** 2006;19(1):165–256.

Fowler E. Chronic wounds: an overview. In: Krasner D, editor. Chronic wound care: a clinical source book for healthcare professionals. King of Prussia, PA: Health Management Publications Inc; 1990. p. 12-8.

Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **Int Wound J** 2006; 3: 225-231.

Gurusamy KS, Koti R, Toon CD, Wilson P, Davidson BR. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in non surgical wounds. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2013;11: Art.nº: CD010427. DOI: 10.1002/14651858.CD010427.pub2.

Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjo Dahl J. Region X, the cell wall-attachment part of staphylococcal protein A. **Eur J Biochem** 1984;138: 413420.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, 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;41:5442–5448.

- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother** 1997;40:135-6.
- Jawetz, Melnick, Adelberg's. **Microbiologia Medica**. 21<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2000. p. 158-162.
- Lister JL, Horwillm A R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Front Cell Infect Microbiol** 2014; 4: 178; doi: 10.3389/fcimb.2014.00178.
- Katayama Y, Zhang Z, Chambers F. PBP 2a Mutations Producing Very- High-Level Resistance to Beta-Lactams. **Antimicrob Agent Chemother** 2004; 48:453-459.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci** 1998; 95:3140-3145.
- Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. Brasília: MS; 2002.
- Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: Where did we go wrong? **Drug Discovery today** 2005; 10(1): 45-52.

Portal da Saúde [internet]. Brasília (DF): Departamento de Saúde Pública (BR);

2016 [citado em 2016 Jan 20]. Disponível em: 2016 -

[http://dab.saude.gov.br/portaldab/smp\\_como\\_funciona.php](http://dab.saude.gov.br/portaldab/smp_como_funciona.php)

Pirret CCNS, Braga IO, Ribas RM, Filho PPG, Filho AD. Pressure ulcers colonized by MRSA as a reservoir and risk for MRSA bacteremia in patients at a Brazilian University Hospital. **Wounds** 2012; 24(2): 64-75.

Ribeiro J, Boyce JM, Pedro Q, Zancanaro PQ. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. **Braz J Infect Dis** 2005;9(1):52-5.

Roghmann MC, Sidiqqi A, Plaisance K, Standiford H. MRSA colonization and the risk of MRSA bacteremia in hospitalized patients with chronic ulcers. **J Hosp Infect** 2001; 47(2):98-103.

Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TSR, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, HernandezRoldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **N Engl J Med**. 2014; 370: 1524-31.

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;37:3556–3563.
- Sibbald RG, Schultz GS, Coutts P, Keast D. Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation. **Ostomy Wound Manage** 2003; 49: 24-51.
- Singh A, Halder S, Menon GR, Chumber S, Misra MC, Sharma LK, Srisvastava A. Meta-analysis of randomized controlled trials on hydrocolloid occlusive dressing versus conventional gauze dressing in the healing of chronic wounds. **Asian J Surg** 2004; 27: 326-32.
- Spratt BG. Multilocus sequence Typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Curr Opin Microbiol** 1999; 2: 312316.
- Tenover FC. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol** 1994; 32:407-415.
- van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Foery F, Etienne J. et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. **J Clin Microbiol** 1998; 36:1653– 1659.
- Vandenesch F, Etienne J. How to prevent transmission of in the open community? **Eurosurveillance** 2004;9:5.

Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Pozzetto B, Berthelot P. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. **Expert Rev Anti Infect Ther** 2014; 12(1):75-89.

Walters M, Lonsway D, Rasheed K, Albrecht, V, McAllister, S, Limbago B, Kallen A. Investigation and Control of Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel. Atlanta, GA 2015.

Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real- time PCR assay. **J Clin Microbiol** 2004; 42(12): 5578-81.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Avaliar a diversidade genética, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- Isolar e identificar amostras de *S. aureus* em feridas e narinas de pacientes atendidos nas unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu.
- Verificar os fatores de risco dos pacientes incluídos no estudo para aquisição de MRSA.
- Identificar os perfis de sensibilidade às drogas pelo método de disco difusão.
- Determinar a ocorrência de resistência à vancomicina.
- Detectar a presença do gene *mecA* de resistência à oxacilina.
- Identificar a presença dos genes *lukS-PV* – *lukF-PV* da leucocidina Panton-Valentine nas amostras incluídas no estudo.
- Identificar o tipo de SCC*mec* nas amostras positivas para o gene *mecA*.

- Identificar os perfis clonais das linhagens de *S. aureus* por meio de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e relacionar a ocorrência dessas com a procedência das amostras.
- Correlacionar as amostras de *S. aureus* das fossas nasais com as isoladas das feridas dos pacientes.
- Determinar os genes codificadores de toxinas e biofilme em amostras de *S. aureus* e relacioná-los com os perfis clonais obtidos.
- Sequenciar linhagens pertencentes aos clusters de maior ocorrência, através de dois métodos de sequenciamento: o MLST e o *spa* typing.
- Georreferenciar os isolados de *S. aureus* e MRSA.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ARTIGO 1:

#### PREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF *Staphylococcus aureus* IN PATIENTS WITH CHRONIC WOUNDS TREATED IN BASIC HEALTH UNITS, BRAZIL

Eliane Patricia Lino Pereira Franchi,<sup>1,2</sup> Danilo Flávio Moraes Riboli,<sup>1</sup> Ligia Maria  
Abraão,<sup>1,2</sup> Katheryne Benini Martins,<sup>1</sup> Maria Rachel Nogueira Barreira,<sup>1</sup> Natália  
de Sousa Lima Moreira da Costa,<sup>1</sup> Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza,<sup>2</sup>  
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute of Botucatu,  
UNESP – State University of São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, Sao  
Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Tropical Diseases, Botucatu Medical School, UNESP – State  
University of São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

#### ABSTRACT:

**Objectives:** Assessing the prevalence and risk factors associated with the  
presence of *S. aureus* and MRSA in wounds of patients treated in the Basic  
Health Units, Botucatu, Brazil.

**Methods:** *S. aureus* were isolated from wound and nasal samples, subjected to the disk diffusion drug test, presence of the resistance gene (*mecA*) and Pantone-Valentine Leucocidine gene (*pvl*), and SCC*mec* type. A questionnaire was administered, and data were analyzed through logistic regression to determine risk factors associated with the presence of *S. aureus* or MRSA.

**Results:** The prevalence of *S. aureus* and MRSA was 51.5% and 8.7%, respectively. Of the *S. aureus* isolates, 85% were resistant to penicillin, 27% to erythromycin, 12% to gentamicin, and 11% to clindamycin. Of the 18 MRSA isolates, 12 had SCC*mec* type IV and 6 type II. PVL gene was detected in only three isolates being all of them oxacillin sensitive. We analyzed the risk factors and the outcomes of interest were isolation of *S. aureus* or MRSA. The analysis showed correlation to the presence of *S. aureus* in both sites, wounds and nostrils ( $p < 0.01$ ) as well as for MRSA carriage ( $p < 0.01$ ). Variables such as age ( $p < 0.01$ ), amoxicillin ( $p < 0.01$ ) and ciprofloxacin use ( $p = 0.04$ ) were associated with a decrease in risk for presence of *S. aureus*. Positive association was found with previous use of benzylpenicillin ( $p = 0.02$ ). No associations were observed for MRSA.

**Conclusions:** Our results indicate a prevalence of *S. aureus* and MRSA in wounds of patients treated in primary care, pointing to a need of control measures for these pathogens.

**Keywords:** *S. aureus*, MRSA, Resistance, Risk factors, Prevalence, Primary care.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is one of the main microorganisms in wound isolates,<sup>1</sup> requiring special care due to its strong propensity to develop antimicrobial resistance and cause infections. Wounds are a risk factor for colonization by the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other multi-resistant microorganisms.<sup>2</sup> This pathogen interferes with wound healing increases the severity of lesions and increases the risk of other types of infection, such as pneumonia or bacteremia, acting as a reservoir and source of pathogens to other subjects.

Current literatures comprise of numerous studies that highlight the importance of MRSA in wounds. However, all of these studies were performed in hospitals, with only a few investigating primary care consultations. This study was performed in basic health units (BHU) of primary care facilities that account for almost 80% of medical consultations and that, coupled to secondary and tertiary care, form the Brazilian health system. Thus, great importance is given to studies that describe the pathogen profile associated with the main infections seen in this scenario, such as *S. aureus* in wounds.

Therefore, given the large number of individuals suffering from these infections and the increasing dissemination of MRSA in hospitals and communities, this study aimed to establish the prevalence and risk factors related to the presence of *S. aureus*, both sensitive and resistant to methicillin, in wounds of patients who attended BHUs in a city in Sao Paulo state, Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

### *Design, study area and population*

This was a transversal and observational study with patients that attended any of the 17 BHUs in the city of Botucatu from 2010 to 2013. Botucatu is a city of the State of Sao Paulo, Brazil, with an estimated population around 122,000 inhabitants. *S. aureus* samples were isolated from wounds and nasal cavities of patients seen in the BHUs.

The study population comprised 171 individuals. We included all existing and new cases of wounds (colonized or infected) and from all etiologies, regardless of patient age. We excluded patients reporting hospital stays, surgeries, and invasive procedures up to one year prior to sample collection.

### *Sample collection and microbiological identification*

Samples were collected at the time of changing the bandages at the BHUs. Before sample collection, the wound was cleaned with 0.9% saline solution using the pressure irrigation technique.<sup>3</sup> A sterile swab (Copan Diagnostics Inc, Murrieta, USA), moistened at the tip with 0.9% saline solution, was pressed on the wound area measuring 1 cm<sup>2</sup> for 5 seconds.<sup>4</sup> We collected samples from the nasal cavity by using sterile swabs moistened with saline solution. These were introduced in both anterior nasal cavities and were rotated in gentle circular motions three times.<sup>5</sup>

After sample collection all materials were immediately forwarded to the Bacteriology Laboratory of the Department of Microbiology and Immunology of the Biosciences Institute of Botucatu—State University of São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)—for seeding on Baird-Paker agar plates (Oxoid Ltd, Basingstoke, England). After incubating at 37°C for 24 to 48 hours the colonies were subjected to Gram staining, catalase and coagulase tests,<sup>6</sup> and amplification of the *S. aureus* specific DNA fragment (Sa442).<sup>7</sup>

### ***Resistance to antimicrobial drugs***

Drug susceptibility tests were performed according to the guidelines of the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI 2015),<sup>8</sup> with disks containing: oxacillin (1µg), cefoxitin (30 µg), penicillin (10 U), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg performed D test), gentamicin (10 µg), levofloxacin (5µg), sulfamethoxazole/ trimethoprim (25 µg), quinupristin/ dalfopristin, (15 µg), linezolid (30 µg), tigecycline (15 µg) and fusidic acid (10 µg). The minimal inhibitory concentrations (MIC) for oxacillin and vancomycin were determined with E-test® strips (Biomeriex, UK).

Vancomycin heteroresistance was screened via the modified macromethod.<sup>9,10</sup> This technique consists of seeding 0.1mL of bacterial inoculum in the exponential growth phase, adjusted to a concentration of  $6 \times 10^8$  CFU/mL (McFarland scale 2), in a Brain Heart Infusion agar plate (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) and applying the E-test® strip impregnated with a stabilized vancomycin

concentration gradient. Between 24 and 48 hours the inoculation at 35°C, searched for microcolonies and colonies.

### ***Bacterial DNA extraction***

The DNA extraction was performed using Illustra Kit (GE, Healthcare, Pittsburg, USA) according the instructions of the manufacturer.

### ***Identification of mecA and pvl***

MRSA classification of *S. aureus* isolates was based on the results of the real time polymerase chain reaction (PCR) of *mecA* and *pvl*. The Fast SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems, Belgium) was used at a total volume of 20 µl: 4.8 µl MilliQ water, 10 µl Fast SYBR®Green Master Mix, 0.6 µl of each primer at 250 nM, and 4 µl of nucleic acid. The thermocycling reaction was performed in the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems, Belgium): 30-second pre-heating at 60°C, followed by 20 seconds at 95°C and 40 cycles of 1-second denaturation at 95°C, and 20-second annealing at 60°C. International reference strains, such as ATCC 33591 – *mecA* positive, ATCC 25923 – *mecA* negative and ATCC 49775 - *pvl*/positive were used. Primers used here were described elsewhere.<sup>11,12</sup>

### ***Characterization of chromosomal cassette***

The multiplex PCR protocol described by Milheiriço et al.<sup>13</sup> was used to characterize the *mec* chromosomal cassette. As controls for SCCmec typing, the COL strain was used for type I; N315 for type IA; PER34 for type II; AN546 for type III; HU25 for type IIIA; MW2 for type IV and JCSC for type V.

### ***Risk factors for S. aureus and MRSA, and statistical analysis***

A structured questionnaire was used to obtain data: social economic status, and demographics (**Table 1**). All information was obtained from patient records and the patients themselves.

Colonized and infected wounds were distinguished based on clinical signs and symptoms of infection.<sup>14</sup> Wounds were classified as infected if at least two of the following signs were observed: fever, erythema (reddening), edema (swelling), pain, local heat and increased purulent secretion.<sup>15</sup>

For univariate analysis, we used the EPI-INFO for Windows software, version 7 (© Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). For comparison between categorical variables, non-parametric tests for proportions were performed ( $\chi^2$  and Fisher's Exact Test – when appropriate). Continuous variables were compared using the Student's t-test and Mann-Whitney U test. Multivariate analysis was performed in SPSS 20 (IBM, Armonk, USA). Outcomes of interest were the overall presence of *S. aureus* or the presence of MRSA independent of the sample collection site. Logistical regression models

were built through a process of backwards variable selection. The criterion for entry and permanence of variables in the model was  $p < 0.05$ .

### *Ethical procedures*

All patients were informed about the study and provided their informed consent. This study was approved by the Ethics Committee of Botucatu Medical School – UNESP (CEP 3127-2009 e 3958-2011).

## RESULTS

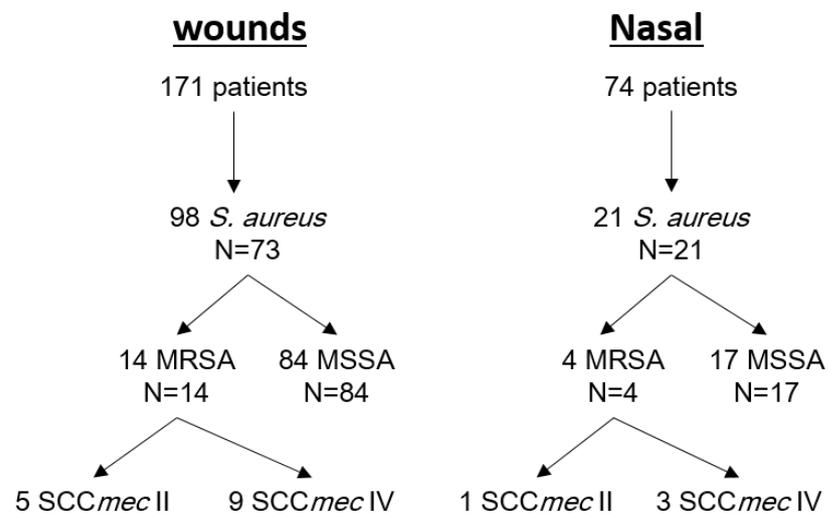
### *Study population characterization*

The study population comprised mostly women ( $n=110$ , 64.3%),  $\geq 60$  years old ( $n=121$ , 83%, mean  $67.2 \pm 13.66$ ) – ranging from 10 to 95 years old – , retired and/or homemakers ( $n=143$ , 83.6%), urban dwellers ( $n=163$ , 95.3%), with an income  $\leq 2$  times the minimum wage ( $n=108$ , 63.2%), illiterate ( $n=46$ , 27%) or with incomplete elementary education ( $n=95$ , 55.5%), displaying comorbidities such as hypertension ( $n=107$ , 62.6%) and diabetes mellitus ( $n=55$ , 32.2%), and with median wound age of 14 months (ranging from 1 to 672 months) of which 34.5% were recurring lesions. In this study, most lesions were classified as colonized ( $n=139$ , 81.3%), and most were venous ulcers ( $n=101$ , 59%), followed by diabetic foot ulcers ( $n=12$ , 7%), pressure ulcers ( $n=10$ , 5.8%), mixed ulcers ( $n=3$ , 1.8%), arterial ulcers ( $n=1$ , 0.6%), and burns ( $n=1$ , 0.6%). Most wounds resulted from trauma ( $n=99$ , 58%) and insect bites ( $n=11$ , 6.5%).

We also recorded household size (average  $3 \pm 1.8$ ), presence of pets (n=83, 48.5%), tobacco smoking (n=24, 14%), alcohol drinking (n=7.4%), and regular participation in sports activities (n=4, 2.4%).

### ***S. aureus* and MRSA prevalence**

Of the 171 patients included in this study, 88 had *S. aureus* and 15 had MRSA in at least one sample collection site. Thus, the prevalence was 51.5% for *S. aureus* and 8.7% for MRSA. Of the 119 *S. aureus* isolates, 98 were collected from wounds of 73 patients; and, of those, 14 were MRSA and 84 were methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA).



**Figure 1:** Flowchart showing the number of nasal and wound *S. aureus* isolates.

Of the nasal swabs, performed in only 74 of these patients, as this goal was only included during the middle of the study period, 21 had *S. aureus*, of which 17 were MSSA and 4 MRSA, 1 SCCmec type II and 3 type IV (Figure 1).

Of the 18 total MRSA isolates, obtained from 15 patients, 12 were SCC*mec* type IV and 6 were SCC*mec* type II.

### ***Resistance to antimicrobial drugs***

Of the 119 *S. aureus* isolates, those displaying resistance to penicillin comprised a majority (n=101, 85%), followed by erythromycin (n= 32, 27%), gentamicin (n= 14, 12%), clindamycin (n= 13, 11%), and levofloxacin (n= 7, 6%) resistance. We did not detect resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim, fusidic acid, tigecycline, quinupristin/dalfopristin, and linezolid.

Similar resistance profiles were observed in several MRSA isolates from different patients. Five out of 6 MRSA SCC*mec* type II isolates were resistant to six antimicrobials (oxa, cfo, lvx, ery, cli, pen), and one out of seven drugs (oxa, cfo, lvx, gen, cli, ery, pen). Among the twelve SCC*mec* type IV isolates, five were resistant to three drugs (oxa, cfo, pen), five were resistant to 4 drugs (oxa, cfo, ery, pen), one was resistant to five drugs (oxa, cfo, gen, ery, pen), and one was resistant to six drugs (oxa, cfo, lvx, cli, ery, pen). The resistance profile of *S. aureus* samples collected from nasal cavities was identical to the profile of the wound isolates in 15 (31%) out of 48 patients who had samples collected from both sites (**Table 2**).

The MIC for oxacillin ranged from 0.12 µg/mL to 256 µg/mL, and for vancomycin from 0.38 µg/mL to 2 µg/mL. MIC<sub>50</sub> was 0.38 µg/mL for oxacillin and 1.5 µg/mL for vancomycin, while MIC<sub>90</sub> was 24 µg/mL for oxacillin and 2 µg/mL

for vancomycin. According to this method, 18 isolates from fifteen patients were resistant to oxacillin and ceftiofloxacin and all isolates were sensitive to vancomycin. Vancomycin heteroresistance screening revealed no positive samples. Resistance to ceftiofloxacin was similar to that observed for oxacillin.

We tested the association of antimicrobial drug resistance and presence of the PVL gene with MSSA and MRSA isolated from wounds. Univariate analysis demonstrated a positive association of resistance to levofloxacin ( $p<0.01$ ), clindamycin ( $p<0.01$ ) and erythromycin ( $p<0.01$ ) with MRSA.

### ***Analysis of risk factors***

The socioeconomic and demographic characteristics, wound/lesion history and previous antibiotic use of patients included in the study are shown in **Table 1**. In the univariate analysis, the significant factors for *S. aureus* presence in the wound were: age (median 63 years,  $p<0.01$ ) and signs of infection ( $p=0.01$ ), with positive association; and, as risk factors for the outcome, schooling, up to complete elementary education ( $p=0.02$ ) and/or greater ( $p=0.01$ ), as well as tobacco smoking ( $p=0.04$ ) and increase in the prevalence of the agent in the years 2010-2013 ( $p<0.01$ ). For the presence of MRSA only the increase of incidence in 2011 compared to 2010 was significant ( $p=0.01$ ).

In the multivariate analysis of factors associated with *S. aureus*, we observed a negative association with age (OR=0.94, CI95%=0.90-0.98,  $p<0.01$ ), use of amoxicillin (OR=0.16, CI95%=0.04-0.60,  $p<0.01$ ) and ciprofloxacin

(OR=0.28, CI95%=0.08-0.98, p=0.04). However, a positive association was observed with the use of benzylpenicillin (OR=3.81, CI95%=1.23-11.82, p=0.02). No associations of risk factors for MRSA were observed in the multivariate analysis.

Nasal sample collection was performed in only 74 (43.3%) of the patients in the study, and among these *S. aureus* was detected in 28.4% and MRSA in 5.4%. Of these patients, 41 (75.5%) had *S. aureus* in the wound and 21 (28.3%) in the nasal cavity. Association was found of the outcome *S. aureus* presence in the wound with nasal carriage of this microorganism (p<0.01), as well as of the outcome presence of MRSA in the wound with its nasal carriage (P<0.01).

## DISCUSSION

The results in this study highlight a poorly addressed issue: the presence of multiresistant pathogens inside primary care facilities. We observed a prevalence of 51.5% for *S. aureus* and 8.7% for MRSA, respectively; resistance to macrolides, lincosamines, aminoglycosides and quinolones in both sensitive and resistant isolates; and a higher frequency of SCC*mec* type IV MRSA, followed by type II.

Studies addressing the prevalence of MRSA in primary care services are sparse.<sup>16,17</sup> In Brazil only two of such studies on patients seen in BHUs have been reported till date, both carried out by the same group in the city of Goiania, Goias State. The first study, a microbiological and antimicrobial assessment of

microorganisms in chronic ulcerations of the leg, described *S. aureus* as the major species (65%) among the isolates, of which 20.5% were resistant to oxacillin and ceftioxin.<sup>18</sup> The second study demonstrated the resistance of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci in isolates from venous ulcers of 68 patients, from 2009 to 2010.<sup>19</sup> In both studies, the prevalence was calculated using the number of samples collected, which was equal to the number of lesions (98 ulcers), rather than the study population, making it impossible for the reader to calculate the real prevalence of *S. aureus* and MRSA. Moreover, there was no risk factor analysis.

The prevalence observed in our study was lower than that found in studies performed in hospital settings, such as Forcade et al.,<sup>16</sup> where MRSA was isolated from 73 out of 119 patients (63%) with skin infections (Skin and Soft Tissue Infections – SSTI); this study was performed in 10 primary care clinics in the state of Texas, USA, from 2001 to 2010. Djahmi et al.<sup>20</sup> studied samples collected from patients with infected diabetic foot ulcers, from 2011 to 2012, in a hospital in Algeria, and the prevalence of *S. aureus* and MRSA was 66.4% and 58.5%, respectively.

In Brazil, Almeida et al.,<sup>21</sup> investigating *S. aureus* and MRSA in patients in a small hospital in the northeastern region of Brazil, detected 20% and 6.4% wound colonization by *S. aureus* and MRSA, respectively. The same study also described the association of wound colonization with nasal carriage, recent antibiotic use, and ward admission. The data agree with our results, which

revealed a positive association between the presence of *S. aureus* in the wound and nasal carriage, the same being true for MRSA. We also observed that 31% of patients had *S. aureus* with the same resistance profile in both wound and nose isolates. Gjødsbøl et al.<sup>22</sup> used Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to compare nasal *S. aureus* with that present in ulcerations of the same patient, showing similar clonal profiles in both isolates, as well as the same resistance profile.

*S. aureus* carriers are important because they may function as an infection reservoir. In a transversal study with adults and children with *S. aureus* skin infections, performed in the cities of Los Angeles and Chicago, USA, *S. aureus* colonization was present in 40% of the patients, and in 50% of their household contacts.<sup>23</sup>

MRSA isolates in this study carried chromosomal cassettes type II (n=6, 33%) and type IV (n=12, 67%) and high levels of resistance to quinolones, macrolides and lincosamine; no isolate had the PVL gene. Other studies, with community patients in the same region, describe those characteristics in circulating clones.<sup>24-26</sup>

Age was independently associated with reduced risk for *S. aureus* presence, with an odds ratio of 0.94, indicating a 6% decrease in the risk of carrying *S. aureus* for every additional year of age. One possible explanation is that, as age increases, patients are exposed to factors that prevent *S. aureus* colonization, which were not assessed in this study; or it may be attributed to the

fact that ecological competition with other microorganisms increases. Similarly, the use of amoxicillin, usually explained by concomitant use of clavulanate, most of the time, and ciprofloxacin, also were protection factors for the acquisition of *S. aureus*, since fluoroquinolone exposure is more related to an increase in the risk of acquisition of MRSA, and not of sensitive isolates.<sup>27</sup>

Prior use of benzylpenicillin was detected as a risk factor for *S. aureus* carriage, as this is one of the most used drugs in primary care,<sup>28</sup> especially in the treatment of infection of chronic wounds. Consistent with our results, *Staphylococcus* spp. currently show, worldwide, a high resistance ( $\geq 80\%$ ), to penicillin G. Van Bijnen et al.<sup>29</sup> described an association of frequent prescription of penicillin with a high odds ratio for nasal carriage of resistant *S. aureus*, after analyzing almost 29 thousand nose swabs from healthy individuals from eight European countries. We, also, observed a high frequency of use of this drug during our analysis of patient records. Penicillin use results in *Streptococcus* death and *S. aureus* permanence.

Some of the limitations of this study include the following: since our work focuses on *S. aureus* we did not perform identification of other putative pathogens; the difficulty in differentiating infection from colonization of chronic wounds, an issue that still is subject of much controversy in the scientific literature; and the failure to include certain characteristics, such as lesion diameter, in the questionnaire.

This is, however, one of the first studies on *S. aureus* and MRSA prevalence in chronic wound patients seen in different BHUs in Brazil for a period of almost three years. Our results point to a high prevalence of *S. aureus* and presence of MRSA that is resistant to several classes of antimicrobials, suggesting the possible dissemination of pathogens among the primary care services in the city studied. These findings call attention to the circulation and potential reservoir of resistant strains in patients without the usual risk factors or exposure to a hospital setting. They also demonstrate the need for more research inside this type of healthcare facilities in order to understand the prevalence and circulation dynamics of multiresistant microorganisms, as well as the possible existence of infections related to healthcare.

## ACKNOWLEDGMENTS

**Financial supports:** This work was supported by São Paulo Research Foundation – FAPESP (2011/10146-7; 2012/00257-9; 2013/10975-9).

**Potencial conflicts of interest:** All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

## REFERENCES

1. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; 3: 225-231.

2. Richard JL, Sotto A, Jourdan N, Combescure C, Vannereau D, Rodier M, Lavigne JP. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab* 2008; 34(4):363-369.
3. Martins EAP, Meneghin P. Avaliação de três técnicas de limpeza do sítio cirúrgico infectado utilizando soro fisiológico. *Cienc Cuid Saude* 2012; 11(suplem.):204-210.
4. Levine NS, Lindberg RB, Mason Jr. AD, Pruitt Jr. BA. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wound. *J Trauma* 1976;16(2):89-94.
5. Pereira EPL, Cunha MLRS. Avaliação da Colonização nasal por *Staphylococcus* spp. Resistente a oxacilina em alunos de enfermagem. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina laboratorial* 2009; 45(5): 361-369.
6. Koneman EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr, WC. *Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
7. 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; 6: 618-23.

8. CLSI. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Phion HO, Wootton M, Howe RA, MacGowan AP, Diekema D. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2439-2444.
10. Maor Y, Rahav G, Belausov N, Ben-David D, Smollan G, Keller N. Prevalence and characteristics of heteroresistant vancomycin -intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care center. *J Clin Microbiol* 2007;45(5): 1511-1514.
11. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *Journal Infect Dis* 2003; 188: 730-7.
12. McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR, Levett PN, Horsman GB. Development of a triplex Real Time PCR assay for detection of Pantone-Valentine Leukocidin toxin genes in clinical isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 6147-49.
13. Milheiriço C, Oliveira DC, Lencastre H. Update to the Multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2007; 51(9): 3374-3377.

14. Wound infection in clinical practice. An international consensus. *Int Wound J* 2008; 5(suppl 3): iii-11.
15. Consensus Development Conference on Diabetes foot wound care: 7-8 april 1999, Boston, Massachusetts. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 1999;22:1354-1360.
16. Forcade NA, Parchman ML, Jorgensen JH, Du LC, Nyren NR, Treviño LB, Peña J, Mann MW, Muñoz A, Treviño SB, Mortensen EM, Wickes BL, Pollock BH, Frei CR. Prevalence, severity, and treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) skin and soft tissue infections in 10 medical clinics in Texas: A South Texas Ambulatory Research Network (STARNet) Study. *J Am Board Fam Med* 2011; 24: 543-550.
17. Pachaman ML, Munoz A. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections presenting in primare care: a south texas ambulatory research network (STARNet) study. *JABFM* 2009; 22(4): 375-379.
18. Martins MA, Tipple AFV, Reis C, Santiago SB, Bachion MM. Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. *Cienc Cuid Saude* 2010; 9(3): 464-470.
19. Martins MA, Santos SLV, Leão LSNO, Araújo NP, Bachion MM. Prevalence of resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus* and

- coagulase-negative isolates of venous ulcers of primary healthcare patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 717-722.
20. Djahmi N, Messad N, Nedjai S, Moussaoui A, Mazouz D, Richard JL, Sotto A, Lavigne JP. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:E398-E404.
21. Almeida GCM, Santos MM, Lima NGM, Cidral TA, Melo MCN, Lima KC. Prevalence and factors associated with wound colonization by *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients in inland northeastern Brazil: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2014;14:328.
22. Gjødsbøl K, Skindersoe ME, Skov RL, Krogfelt KA. Cross-contamination: Comparison of nasal and chronic Leg ulcer *Staphylococcus aureus* strains isolated from the same patient. *The Open Microbiol Journal* 2013; 7:6-8.
23. Miller LG, Eells SJ, Taylor AR, et al. *Staphylococcus aureus* colonization among household contacts of patients with skin infections: risk factors, strain discordance, and complex ecology. *Clin Infect Dis* 2012; 54(11):1523-35.
24. Pires FV, Cunha MLRS, Abraão LM, Faccioli-Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CMCB. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *Plos One* 2014; 9(3): e92537. doi:10.1371/journal.pone.0092537

25. Witzel CL, Fortaleza CMCB, Souza CSM, Riboli DFM, Cunha MLRS. Nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* among imprisoned males from Brazil without exposure to healthcare: risk factors and molecular characterization. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13: 25.
26. Bonesso MF, Marques SA, Camargo CH, Fortaleza CMCB, Cunha MLRS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non outbreak skin infections. *Braz J Microbiol* 2014;4:1401-1407.
27. Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmelli Y. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(11):1415-1422.
28. Abrantes PM, Magalhães SMS, Acúrcio FA, Sakurai E. Avaliação da qualidade das prescrições de antimicrobianos dispensados em unidades públicas de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(1):95-104.
29. van Bijnen EME, Paget J, Lange-de-Klerk ESM, den Heijer CDJ, Vesporten A, Stobberingh EE, Goossens H, Schellevis FG. Antibiotic exposure and other risk factors for antimicrobial resistance in nasal commensal *Staphylococcus aureus*: an ecological study in 8 European countries. *Plos one* 2015; 10(8): e0135094.doi:10.1371/journal

## TABLES

**Table 1:** Univariate and multivariate analysis of risk factors for carriage of *Staphylococcus aureus* and MRSA in patients attended at basic health units of the city of Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.

Risk factors	Univariate analysis		OR (CI95%)	P	Multivariate analysis OR (CI95%)	P
	<i>S. aureus</i> (n=88)	Others (n=83)				
<b>Social/economic and demographic data</b>						
Males	32(52.46)	29(47.54)	1.06(0.57-1.99)	0.85		
<b>age – median</b>	<b>63(55-73.5)</b>	<b>72(63-81)</b>	<b>0.96 (0.94-0.99)</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.94 (0.90-0.98)</b>	<b>&lt;0.01</b>
Countryside	4(4.55)	4(4.2)	0.94(0.23-3.89)	1		
Home-ownership	70(79.55)	64(77.11)	0.86(0.41-1.79)	0.69		
Water treatment	86(97.73)	77(92.77)	0.29 (0.05-1.52)	0.15		
Sewage treatment	82(93.18)	76(91.57)	0.79 (0.25-2.46)	0.69		
Paved road	79(89.77)	73(87.95)	1.2(0.46-3.12)	0.7		
Family income <sup>a</sup> - ≤ 2 wages	54(61.36)	54(65.06)	reference	-		
- 3-4 wages	29(32.95)	25(30.12)	1.16(0.6-2.23)	0.66		
- ≥ 4 wages	5(5.68)	4(4.82)	1.25(0.32-4.91)	0.74		
alcoholism <sup>b</sup>	4(4.55)	3(3.61)	1.26(0.27-5.84)	0.76		
<b>Tobacco smoking</b>	<b>17(19.32)</b>	<b>7(8.54)</b>	<b>2.56(1-6.55)</b>	<b>0.04</b>		
Regular sports practice	1(1.15)	3(3.61)	0.31(0.03-3.12)	0.35		
retired/homemaker	69(84.15)	74(93.67)	2.78(0.94-8.22)	0.05		
Presence of pets	45(51.14)	38(45.78)	1.24 (0.68-2.26)	0.48		
Household size	3(2-4.5)	2(2.5-4)	1.05( 0.89-1.24)	0.2		
Schooling – illiterate	16(18.39)	30(36.14)	reference	-		
<b>&lt; elementary</b>	<b>52(59.77)</b>	<b>43(51.81)</b>	<b>2.26(1.09-4.69)</b>	<b>0.02</b>		
<b>≥ elementary</b>	<b>19(21.84)</b>	<b>10(12.05)</b>	<b>2.56(1.34-9.46)</b>	<b>0.01</b>		
<b>Health and lesion history</b>						
Diabetes	28(32.18)	27(32.93)	0.96 (0.5-1.84)	0.91		
arterial hypertension	55(62.5)	52(62.65)	0.99(0.53-1.85)	0.98		
Dyslipidemia	21(23.86)	15(18)	1.42(0.67-2.98)	0.35		
Obesity	6(6.82)	3(3.61)	1.95(0.47-8.07)	0.49		
Cardiovascular diseases	9(10.23)	11(13.41)	0.73(0.29-1.88)	0.51		
Mental diseases	5(5.68)	7(8.43)	0.65(0.19-2.15)	0.48		
Thyroid diseases	2(2.27)	4(4.82)	0.45(0.08-2.58)	0.36		
Year of collection-2010	34(38.64)	48(57.83)	Reference	-		

- 2011	10(11.36)	6(7.23)	2.35(0.78-7)	0.12		
- 2012	25(28.41)	22(26.51)	1.6 (0.7-3.3)	0.19		
<b>- 2013</b>	<b>19(21.59)</b>	<b>7(8.43)</b>	<b>3.8 (1.4-10.1)</b>	<b>&lt;0.0</b>		
				<b>1</b>		
<b>Signs of infection</b>	<b>10(11.36)</b>	<b>22(26.51)</b>	<b>0.35(0.15-0.80)</b>	<b>0.01</b>		
Recurring lesion	34(38.64)	25(30.12)	1.46(0.77-2.46)	0.24		
Venous ulcer	57(64.77)	44(53)	0.61(0.33-1.33)	0.11		
Wound age – median	14(3-108)	5(2-132)	0.99(0.99-1)	0.19		
<b>Previous antibiotic therapy</b>						
<b>Amoxicillin</b>	<b>13(14.77)</b>	<b>22(16.51)</b>	<b>0.48(0.22-1.03)</b>	<b>0.05</b>	<b>0.16 (0.04-0.60)</b>	<b>&lt;0.01</b>
Azithromycin	2(2.27)	1(1.2)	1.9 (0.16-21.43)	1		
Bactrim	6(6.82)	5(6.02)	1.14(0.33-3.89)	0.83		
<b>Benzylpenicillin</b>	<b>25(28.41)</b>	<b>15(18.29)</b>	<b>1.77 (0.85-3.66)</b>	<b>0.12</b>	<b>3.81 (1.23-11.82)</b>	<b>0.02</b>
Cephalexin	49(55.68)	49(59.04)	0.87(0.47-1.59)	0.65		
Clindamycin	11(12.5)	17(20.48)	0.55 (0.25-1.26)	0.15		
<b>Ciprofloxacin</b>	<b>12(13.64)</b>	<b>16(19.28)</b>	<b>0.66(0.29-1.49)</b>	<b>0.31</b>	<b>0.28 (0.08-0.98)</b>	<b>0.04</b>
Erythromycin	4(4.55)	2(2.41)	1.92 (0.34-0.81)	0.68		
Gentamicin	1(1.2)	1(1.14)	0.94(0.05-5.31)	1		
Levofloxacin	1(1.15)	5(6.02)	0.18 (0.02-1.58)	0.11		

Note: all data are expressed as percentages (%), except where specified. Significant results are highlighted in bold. OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval.

<sup>a</sup>Data refer to monthly family income in minimum wages

<sup>b</sup>Regular consumption of alcoholic beverages, over twice a week.

**Table 2:** Characterization of MRSA isolates from patients attended at basic health units (BHUs) of the city of Botucatu, Sao Paulo State, Brazil

Patient	MRSA	Type	Resistance	Origin	BHU
1	1	II	oxa, cfo, lvx, cli, ery, pen	wound*	CSE-UVF
2	2	II	oxa, cfo, lvx, cli, ery, pen	wound*	CSE-UVL
3	3	II	oxa,cfo, lvx, cli, ery, pen	wound*	Cohab I
4	4	II	oxa, cfo, lvx, cli, ery, pen	Wound	Iolanda
	5	II	oxa, cfo, lvx, cli, ery, pen	Nasal	
5	6	II	oxa, cfo, lvx, gen, cli, ery, pen	wound*	Aeroporto
6	7	IV	oxa, cfo, lvx, cli, ery, pen	wound*	CSE-UVL
	8	IV	oxa, cfo, pen	Wound	Iolanda
	9	IV	oxa, cfo, pen	Nasal	
8	10	IV	oxa, cfo, pen	Wound	Vitoriana
9	11	IV	oxa, cfo, pen	Wound	César-Neto
10	12	IV	oxa, cfo, pen	Wound	Cecap
11	13	IV	oxa, cfo, gen, ery, pen	wound*	Cohab I
12	14	IV	oxa, cfo, ery, pen	wound*	Marajoara
13	15	IV	oxa, cfo, ery, pen	Wound	César-Neto
14	16	IV	oxa, cfo, ery, pen	Nasal	Cohab I
	17	IV	oxa, cfo, ery, pen	Wound	Cohab I
	18	IV	oxa, cfo, ery, pen	Nasal	

\* no nasal swab. oxa: oxacillin; cfo: cefoxitin; lvx: levofloxacin; gen: gentamicin; cli: clindamycin; ery: erythromycin; pen: penicillin.

## 4.2 ARTIGO 2

### EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE MRSA NA ATENÇÃO PRIMÁRIA, BRASIL.

Eliane Patricia Lino Pereira Franchi,<sup>1,3</sup> Danilo Flávio Moraes Riboli,<sup>1</sup> Ligia Maria Abraão,<sup>1,3</sup> Katheryne Benini Martins,<sup>1</sup> Maria Rachel Nogueira Barreira,<sup>1</sup> Natália de Sousa Lima Moreira da Costa,<sup>1</sup> Cassiano Victória,<sup>2</sup> Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza,<sup>3</sup> Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

**RESUMO:** Trata-se de um estudo transversal observacional realizado de 2010 à 2013 que objetivou avaliar a epidemiologia molecular e georreferenciamento de *S. aureus* isolados de feridas e narinas de pacientes atendidos nas UBSs de

um município brasileiro. Foram estudados 119 *S. aureus* isolados de feridas e adicionalmente narinas de 88 pacientes. Para caracterização dos isolados foi realizado a identificação dos genes de virulência para enterotoxinas A-E, hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ , esfoliatinas A, B e D, produção de biofilme, Leucocidina Panton-Valentine e Toxina-1 da Síndrome do choque tóxico, tipagem por *Pulsed Field Gel Eletroforese* (PFGE), *Multilocus sequence typing* (MLST) e *spa* typing. Foram identificados 18 isolados de MRSA, destes 6 foram SCC*mec* tipo II e 12 tipo IV e 101 (85%) MSSA. Houve a formação de oito clusters na tipagem por PFGE, com predominância de MSSA que apresentaram as STs: 5, 30, 188, 1635 e *spa* t002. Os 18 MRSA foram caracterizados pelos STs: 5, 8 e 1176 e pelos *spas* t002 e t062. Houve isolado semelhante aos clones USA300, USA500 e USA800. Os resultados demonstram ampla disseminação de clones de MSSA e MRSA com genes de hemolisinas, biofilme e toxinas. De acordo com a distribuição de Kernel, a maior densidade para presença de *S. aureus* foi encontrada nas UBSs Cecap, Jd Iolanda e Cohab I.

**Palavras chave:** *S. aureus*, MRSA, feridas, Atenção primária, Epidemiologia.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais micro-organismos causadores de infecções dentro dos hospitais e também na comunidade,

principalmente quando o assunto é feridas. Há décadas vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de conhecer a epidemiologia, evolução e mecanismos de patogênese utilizados por esse agente, que possui um grande potencial para aquisição de genes de resistência e virulência.

Este é um dos primeiros estudos realizado no Brasil com o intuito de visualizar a epidemiologia e disseminação de *S. aureus* dentro da dinâmica do atendimento primário de saúde. As Unidades Básicas de Saúde (UBS) são a principal porta de entrada para o sistema de saúde e responsáveis por aproximadamente 80% de toda assistência em saúde do país, sendo escasso (Martins, 2010, 2012) o número de pesquisas nesse ambiente e com esse enfoque.

Devido a disseminação do Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) torna-se de grande importância a realização de estudos epidemiológicos para conhecimento do perfil predominante de resistência dos clones circulantes, permitindo maior eficácia no controle, prevenção e tratamento de infecções causadas por MRSA. Este estudo teve como objetivo estudar a epidemiologia molecular e georreferenciada de *S. aureus* isolados de feridas e narinas de pacientes atendidos nas UBSs de um município brasileiro.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Design, amostragem e local de estudo***

Trata-se de um estudo transversal observacional realizado de 2010 à 2013. Este estudo foi realizado na cidade de Botucatu-SP, Brasil (22°53'09"S,48°26'42"). A cidade possui aproximadamente 122 mil habitantes e está a cerca de 240 km da capital do estado, São Paulo, cidade mais populosa do país.

No período de estudo a cidade dispunha de uma rede de atenção básica composta por 17 UBSs. Todos os casos existentes e novos de feridas, colonizadas ou infectadas, de todas as etiologias, independente da idade do paciente foram incluídos no estudo. Excluiu-se aqueles pacientes que relataram hospitalização, cirurgia, e procedimentos invasivos até um ano anterior à coleta.

Foram estudados 119 *S. aureus* isolados de feridas e narinas de 88 pacientes assistidos por qualquer uma das UBSs do município. Para a diferenciação entre ferida colonizada e infectada foi utilizada a observação de ao menos dois dos sinais e sintomas clínicos de infecção: febre, eritema (rubor), edema (tumor), dor, calor local e aumento de secreção purulenta (Consensus Diabetes, 1999; International Consensus, 2008), e a maioria das feridas foi classificada como colonizadas (n=139; 81,3%).

### ***Coleta e Identificação microbiológica***

Os procedimentos de coleta foram realizados junto às trocas de curativo acompanhadas e executadas nas UBSs. Primeiramente, foi realizado a limpeza da ferida com soro fisiológico 0,9% através da técnica de irrigação (Martins et al., 2012) e depois coletado o material utilizando um swab estéril (Copan

Diagnostics Inc., Murrieta, USA) umedecido em sua extremidade com soro fisiológico a 0.9%, através da pressão de 1cm<sup>2</sup> da área da ferida por 5 segundos (Levine et al., 1976). Em seguida, o swab foi depositado no interior de um recipiente contendo meio de transporte stuart. Junto às coletas do material da ferida, também foi coletado material das fossas nasais, utilizando swabs estéreis umedecidos com salina, introduzido em ambas fossas nasais anteriores, fazendo movimentos circulares delicados por três vezes (Pereira; Cunha, 2009).

Após a coleta, os materiais foram imediatamente encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, para realização de semeadura em placas contendo ágar Baird- Parker (Oxoid Ltd., Basingstoke, England). Após incubação a 37°C por 24 à 48 horas as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos micro-organismos isolados. As colônias foram submetidas à coloração de Gram objetivando avaliar características de sua morfologia e coloração específica. Logo após, as linhagens foram submetidas às provas de catalase, coagulase (Koneman et al., 1997) e amplificação de fragmento de DNA específico (Sa442) para *S. aureus* (Martineau et al., 1998).

### ***Extração de DNA bacteriano***

Para a extração do DNA bacteriano foi utilizado o Kit Illustra (GE, Healthcare, Pittsburg, USA) seguindo instruções do fabricante.

### ***Triagem para MRSA, gene codificador da Leucocidina Panton-Valentine e identificação do SCCmec***

Para a classificação de *S. aureus* em MRSA através da identificação do gene *mecA* e também identificação do gene codificador da Leucocidina Panton-Valentine (*pvl*) foi utilizado a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Utilizou-se o Fast SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems, Belgica) em volumes totais de 20 µl contendo 4,8 µl de água MiliQ, 10 µl do Fast SYBR®Green Master Mix, 0,6 µl de cada iniciador a 250 nM e 4 µl do ácido nucléico. A termociclagem e leitura foi realizada no aparelho StepOnePlus™ system (Applied Biosystems, Belgica), empregando os seguintes parâmetros: pré aquecimento de 30 segundos a 60°C, seguido de 20 segundos a 95°C e 40 ciclos de desnaturação por 1 segundo a 95°C e anelamento por 20 segundos a 60°C. Foram utilizados primers previamente descritos (Vandecasteele et al., 2003; McDonald et al., 2005). Foram utilizados os controles: ATCC 49775 (*pvl*); ATCC 33591 (*mecA* positivo) e ATCC 25923 (*mecA* negativo).

Foi usado o protocolo de PCR multiplex descrito por Milheiriço et al. (2007) para a caracterização do cassete cromossômico *mec*. 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; MW2 para o SCC*mec* tipo IV e JCSC4469 para o SCC*mec* tipo V.

### ***Identificação de genes de virulência***

Para a identificação dos genes codificadores de enterotoxinas A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*), genes relacionados a produção de biofilme (*icaAD*), Toxina 1 da Síndrome do choque tóxico - TSST-1 (*tst*), hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  (*hla*, *hlb* e *hld*) e esfoliatinas A, B e C (*eta*, *etb* e *etd*) foram realizadas reações com volume total de

25 $\mu$ l, contendo 10 pmol de cada primer, 100 $\mu$ M de DNTP, 10mM tris-HCl (pH 8,4), 0,75mM MgCl<sub>2</sub>, 2,0 U de taq-DNA polimerase e 3 $\mu$ l de ácido nucleico. As sequências dos primers e condições de amplificação utilizados já foram descritos anteriormente. (Arciola et al., 2001; Johnson et al., 1991; Okuma et al., 2002; Marconi et al., 2005). Foram usados controles em todas as reações: ATCC 13565 (*sea* positivo), ATCC 14458 (*seb* positivo), ATCC 19095 (*sec* positivo), ATCC 23235 (*sed* positivo), ATCC 51650 (*tst* positivo), cepa N315 (*hla* e *hld*), cepa RN4420 (*hlb*), cepa ZM (*eta*) e cepa N5 (*etb*); água foi utilizado como template negativo. Para visualização das amplificações foi realizada a eletroforese com gel de agarose a 1,5% e coloração com syber-safe.

### ***PFGE, MLST e spa typing***

Todos os isolados de *S. aureus* foram tipados através do *Pulsed-Field Gel Eletroforesis* (PFGE) utilizando o protocolo modificado de McDougal et al. (2003) assim como foi detalhadamente descrito por Pereira et al. (2014). A análise de similaridade foi realizada com valores  $\geq 80\%$  e os dendogramas desenhados com base no Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) do software BioNumerics 7.0 (Applied Maths, Belgica). Foi considerado um cluster o agrupamento de quatro ou mais isolados.

*Multilocus sequence typing* (MLST) foi realizado de acordo com o descrito por Enright et al. (2000) e as análises dos resultados realizados de acordo com os dados do site oficial do MLST ([http:// saureus.mlst.net](http://saureus.mlst.net)). Para spa typing foi utilizado protocolo descrito por Shopsin et al. (1999) e as análise realizadas no software BioNumerics 6.1 (Applied Maths, Belgica), através de plugin específico de acesso ao banco de dados do Ridom Spa Server (<http://www.spaserver.ridom.de>). Foram escolhidos um ou dois isolados de cada cluster formado no PFGE para a realização de MLST e spa typing.

Para efeitos de comparação com os clones pandêmicos circulantes, foram utilizadas as cepas NCTC 8325 (controle para PFGE); *SCCmec* tipo I: (NCTC 10442-ST250); *SCCmec* tipo II: (N315-ST5), BK2464 NY/JPN; *SCCmec* tipo III: 85/2082-ST239, A1721/HU25 (Clone Brasileiro Epidêmico); *SCCmec* tipo IV: JCSC 1968-ST256, WB72 (USA300/ST8), WB48 (USA500), JCSC

4469, USA800/ST5, HAR 24(EMRSA 15) ST22, OSPC ST30, MW2 (USA400) ST1.

### ***Georreferenciamento***

A geocodificação dos endereços foi realizada no software QGIS 2.8.2, após a estruturação em planilha eletrônica dos endereços para o formato brasileiro com os componentes: tipo de logradouro, nome do logradouro, número da edificação, nome do bairro, região, município, estado, país (Douglas et al., 2012). Em seguida a planilha foi convertida para o formato CSV com codificação UTF-8 para posterior importação e geocodificação pelo referido software. Após a geocodificação os dados foram importados para o software ArcGIS 10.1 onde foram realizadas análises de distribuição dos dados de interesse pelo interpolador de kernel para a distribuição dos casos e dos pacientes positivos aos *S. aureus*. Em seguida foram gerados mapas com a utilização do sistema de coordenadas geográficas GCS Sirgas 2000, com datum planimétrico SIRGAS 2000.

### ***Análise estatística***

Para a análise foi utilizado o software EPI-INFO for windows, versão 7 (© Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Para comparação entre as variáveis categóricas foram realizados testes não-paramétricos para proporção:  $X^2$  e Teste Exato de Fisher (quando

recomendável). Variáveis contínuas foram comparadas através do Teste T de Student e teste U de Mann Whitney. As análises multivariadas foram realizadas em modelos de regressão logística.

### ***Procedimentos éticos***

Todos os pacientes foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)-UNESP (Protocolos CEP 3127-2009 e 3958-2011).

## ***RESULTADOS***

Do total de 88 pacientes, foram isolados 119 *S. aureus*, sendo 18 (15%) MRSA, seis destes com SCC*mec* tipo II e doze com SCC*mec* tipo IV; e 101 (85%) Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus - MSSA. Os 18 isolados de MRSA pertenceram a 15 pacientes, sendo quatro de amostras nasais e 14 de feridas; e os 101 MSSA foram isolados de 73 pacientes, com 17 isolados das fossas nasais e 84 de feridas. A coleta de narinas foi realizada em apenas 48 dos 88 pacientes incluídos no estudo, pois só foi incluída na segunda metade do estudo, quando percebeu-se a importância desses resultados.

A pesquisa de genes de virulência nos 119 isolados de *S. aureus* demonstrou que 50 (42%) apresentaram genes da enterotoxina A, 13 (11%) da enterotoxina B, 31 (26%) da enterotoxina C, 1 (0,8%) da enterotoxina D, 119

(100%) com o gene *icaA*, 114 (95,8%) com o gene *icaD*, 116 (97,5%) com o gene da hemolisina alfa, 77 (65%) positivos para o gene da hemolisina beta, 113 (95%) com o gene da hemolisina delta, 5 (4,2%) com o gene da TSST-1 e 3 (2,5%) positivos para o gene da Leucocidina Pantón-Valentine (*pvf*). Não foi detectada a presença de gene para as esfoliatinas A, B e D, assim como para a enterotoxina E. A análise estatística não demonstrou associação de MRSA ou MSSA com os genes de virulência e o mesmo ocorreu quando comparado a presença de genes em MRSA com SCC*mec* tipo II ou SCC*mec* tipo IV.

A tipagem por PFGE identificou a presença de oito grupos clonais distribuídos em onze das 17 UBSs e apresentou 8 diferentes tipos de sequências: ST5, ST1635, ST1176, ST1, ST8, ST188. A tipagem por PFGE, MLST, spa typing, genes de virulência e UBS de origem estão sumarizados na **Tabela 1**. O maior cluster apresentou apenas isolados de MSSA ST1635/t002 e presença dos genes para enterotoxinas A, B e C, hemolisinas e biofilme. Houve o agrupamento de isolados de MRSA junto aos de MSSA nos clusters B e C, sendo que nas amostras MRSA foram identificadas os ST5, ST8 e ST1176 e os spas t002, t008, t062, enquanto que para os MSSA foram encontrados os ST1, ST5, ST30, ST188 e ST1635 e spas t002 e t189.

A presença do gene codificador da PVL só foi identificado em três isolados de MSSA, sendo que dois destes foram semelhantes (ST1), ambos coletados de feridas, mas coletados de pacientes assistidos em UBSs distintas. Houve um MRSA isolado de ferida similar ao clone USA300, apresentando a

mesmas características do clone americano, com exceção do gene da PVL (ST8/t008/PVL-). Outro MRSA (ST5/t002/II) isolado de ferida agrupou com o clone internacional USA500. Os resultados também revelaram um MSSA isolado da fossa nasal similar a outro clone mundial, o USA800 (ST5). Algumas amostras apresentaram 100% de similaridade entre elas: três isolados de feridas coletados em UBSs distintas (UVL, São Lúcio e Cohab I) com ST30, sendo duas *tst* + e uma PVL+; duas amostras de feridas ST188, ambas coletadas do CS Cecap; e duas amostras também de feridas ST188, ambas coletadas de pacientes do CSI.

**Tabela 1:** Principais agrupamentos e características dos isolados de *S. aureus* tipados pelo PFGE, tipo de ST, *spa*, *SCCmec*, genes de virulência e UBS de origem.

PFGE	MLST	<i>Spa</i>	<i>SCCmec</i>	Presença genes de virulência	UBS	Total <sup>A</sup>
A	ST1635	t002	-	<i>sea</i> (8), <i>seb</i> (2), <i>sec</i> (4), <i>hla</i> (12), <i>hlb</i> (6), <i>hld</i> (12), <i>icaA</i> (12), <i>icaD</i> (11)	Iolanda (3); UVF(2); CSI (1); César-Neto (1); Jd Cristina (1); São Lúcio (1); UVL (1); Cohab I (1); Cecap (1).	12
B	ST5	t002	II (1); IV(3)	<i>sea</i> (1), <i>seb</i> (1), <i>hla</i> (6), <i>hlb</i> (3), <i>hld</i> (6), <i>icaA</i> (6), <i>icaD</i> (6)	Cohab I (2); UVL (1); César-Neto (1); Cecap (1); Peabirú (1)	6
C	ST5; ST1176	t002	IV (2)	<i>sea</i> (4), <i>sec</i> (1), <i>sed</i> (1), <i>hla</i> (8), <i>hlb</i> (8), <i>hld</i> (8), <i>icaA</i> (8), <i>icaD</i> (8)	Cecap (3); Cohab (1); Iolanda (1); Marajoara (1); César-Neto (1)	8

D	ST1	t002	-	<i>sea</i> (2), <i>seb</i> (1), <i>sec</i> (1), <i>hla</i> (4), <i>hlb</i> (4), <i>hld</i> (4), <i>icaA</i> (4), <i>icaD</i> (4)	UVL(2); Vitoriana (1); Iolanda (1)	4
E	ST5	t008	-	<i>sea</i> (1), <i>sec</i> (3), <i>tst</i> (1), <i>hla</i> (4), <i>hlb</i> (4), <i>hld</i> (4), <i>icaA</i> (4), <i>icaD</i> (3)	UVF (2); Cecap (1); Iolanda (1)	4
F	ST8	t002	-	<i>sea</i> (2), <i>seb</i> (1), <i>sec</i> (2), <i>hla</i> (4), <i>hlb</i> (3), <i>hld</i> (4), <i>icaA</i> (4), <i>icaD</i> (3)	Cecap (2); Jd Cristina (1); Peabirú (1)	4
G	ST188	t189	-	<i>sea</i> (1), <i>hla</i> (4), <i>hlb</i> (4), <i>hld</i> (3), <i>icaA</i> (4), <i>icaD</i> (4)	UVF (1); Peabirú (1); Aeroporto (1); Cohab I (1)	4
H	ST188	t189	-	<i>sea</i> (3), <i>seb</i> (1), <i>sec</i> (1), <i>hla</i> (3), <i>hlb</i> (4), <i>hld</i> (4), <i>icaA</i> (4), <i>icaD</i> (4)	São Lúcio (2); Iolanda (1); Jd Cristina (1)	4

### Agrupamentos Importantes

Obs.	MLST	Spa	SCCmec	Presença genes de virulência	UBS	Total <sup>A</sup>
100% similar	ST30	NS	-	<i>PVL</i> (1), <i>tst</i> (2), <i>sea</i> (2), <i>sec</i> (3), <i>hla</i> (3), <i>hlb</i> (3), <i>hld</i> (3), <i>icaA</i> (3), <i>icaD</i> (3)	São Lúcio; UVL (1); Cohab I (1)	3
	ST5	t002; t062	II (2)	<i>sea</i> (3), <i>hla</i> (3), <i>hlb</i> (3), <i>hld</i> (3), <i>icaA</i> (3), <i>icaD</i> (3)	UVF (1); Peabirú (1); Iolanda (1)	3
PVL+	ST1	t189	-	<i>PVL</i> (2), <i>sea</i> (2), <i>sec</i> (1), <i>hla</i> (1), <i>icaA</i> (2), <i>icaD</i> (2)	UVL (1); Cohab I (1);	2
100% similar	ST188	t189	-	<i>seb</i> (1), <i>hla</i> (2), <i>hlb</i> (2), <i>hld</i> (2), <i>icaA</i> (2), <i>icaD</i> (2)	Cecap (2)	2
100% similar	ST188	t189	-	<i>sea</i> (1), <i>hla</i> (2), <i>hlb</i> (2), <i>hld</i> (2), <i>icaA</i> (2), <i>icaD</i> (2)	CSI (2)	2
Agrupou/ /USA300	ST8	t008	IV	<i>sea</i> (1), <i>sec</i> (1), <i>hla</i> (1), <i>hlb</i> (1), <i>hld</i> (1), <i>icaA</i> (1), <i>icaD</i> (1)	Vitoriana(1)	1
Agrupou/ USA800	ST20	t189	-	<i>hla</i> (1), <i>hlb</i> (1), <i>hld</i> (1), <i>icaA</i> (1), <i>icaD</i> (1)	São Lúcio (1)	1
Agrupou/ USA500	ST5	t002	II	<i>hla</i> (1), <i>hlb</i> (1), <i>hld</i> (1), <i>icaA</i> (1), <i>icaD</i> (1)	Cohab I (1)	1
	ST5	t002	II (1); IV (1)	<i>hla</i> (2), <i>hlb</i> (2), <i>hld</i> (2), <i>icaA</i> (2), <i>icaD</i> (2)	Aeroporto (1); UVL (1)	2

Nota: foi considerado um cluster o grupo de  $\geq 4$  isolados com similaridade  $\geq 80\%$ . Achados importantes com agrupamento de  $\leq 3$  isolados foram descritos em "agrupamentos importantes".

(n): número de amostras positivas.

NS: não foram sequenciadas

\* Total de amostras agrupadas no cluster

Quando caracterizamos apenas os isolados de MRSA, verificamos que estes foram agrupados em apenas dois (B e C) dos oito clusters formados, sendo que a maioria não se agrupou. Houve predominância do ST5/t002, tanto para o SCCmec tipo II quanto para o tipo IV. Foram isolados quatro MRSA de swabs nasais, sendo um isolado com SCCmec II/ST5 e três com SCCmec tipo IV/ST5; e 14 de feridas, destes cinco com SCCmec tipo II/ST5 e 9 com SCCmec tipo IV apresentando ST5 (6), ST8 (1) e ST1176 (2), **Tabela 2**.

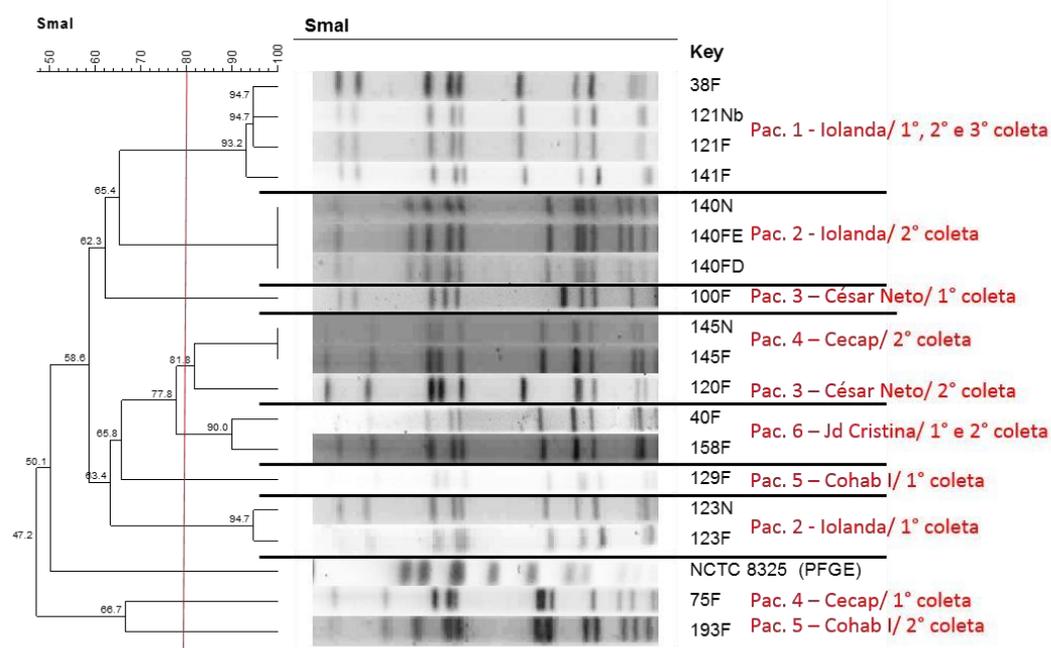
Também foi realizada a tipagem de *S. aureus* coletados concomitantemente dos swabs nasais e de feridas referentes a 48 pacientes, demonstrando que 11 (23%) pacientes portaram o mesmo pulso tipo no nariz e na ferida. Apesar de ser utilizado apenas uma coleta para as análises, devido as idas constantes nas UBSs e a pedido do paciente e/ou da equipe de saúde, em seis pacientes foram realizadas mais de uma coleta em diferentes momentos do estudo. A **Figura 1** mostra a tipagem desses isolados, em que apenas dois pacientes (Pac. 1 – Iolanda e Pac. 6 – Jd Cristina) apresentaram isolados semelhantes nas diferentes coletas.

**Tabela 2:** Caracterização dos isolados de MRSA: tipo de SCC*mec*, PFGE, MLST, spa, origem e UBS.

Paciente	MRSA	Tipo	Genes de virulência	PFGE	MLST	Spa	Origem	UBS
1	1	II	<i>sea, hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	ferida *	CSE-UVF
2	2	II	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	B	5	t002	ferida *	CSE-UVL
3	3	II	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	ferida*	Cohab I
4	4	II	<i>sea, hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t062	Ferida	Iolanda
	5	II	<i>sea, hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t062	Nasal	
5	6	II	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	ferida*	Aeroporto
6	7	IV	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	ferida*	CSE-UVL
7	8	IV	<i>seb, hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	Ferida	Iolanda
	9	IV	<i>sea, hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	Nasal	
8	10	IV	<i>sea, sec, hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	8	t008	Ferida	Vitoriana
9	11	IV	<i>seb, hla, hlb, hld, icaAD</i>	B	5	t002	Ferida	César Neto
10	12	IV	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	Ferida	Cecap
11	13	IV	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	1176	t002	ferida*	Cohab I
12	14	IV	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	C	1176	t002	ferida*	Marajoara
13	15	IV	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	C	5	t002	Ferida	César Neto
14	16	IV	<i>hla, hlb, hld, icaAD</i>	-	5	t002	Nasal	Cohab I
15	17	IV	<i>hla, hld, icaAD</i>	B	5	t002	Ferida	Cohab I
	18	IV	<i>hla, hld, icaAD</i>	B	5	t002	Nasal	

\* não houve coleta nasal.

- Não agrupou em nenhum cluster



**Figura 1:** Formação de clusters usando isolados de pacientes em que foram coletadas amostras em dois ou três momentos da pesquisa.

A distribuição do *S. aureus* e MRSA dentro do município de Botucatu, apresentou a configuração expressa na **Figura 2- 4**.

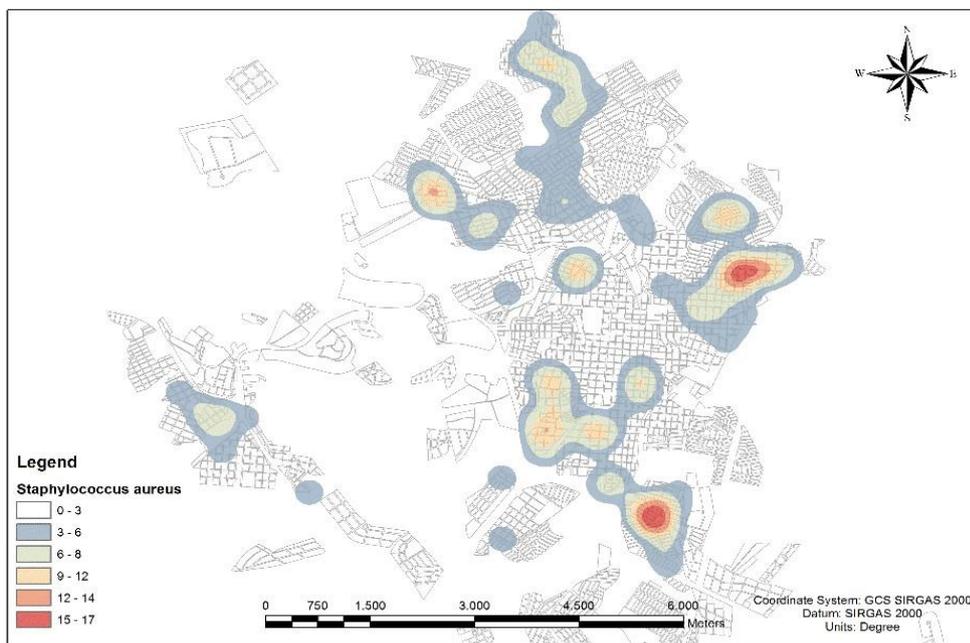
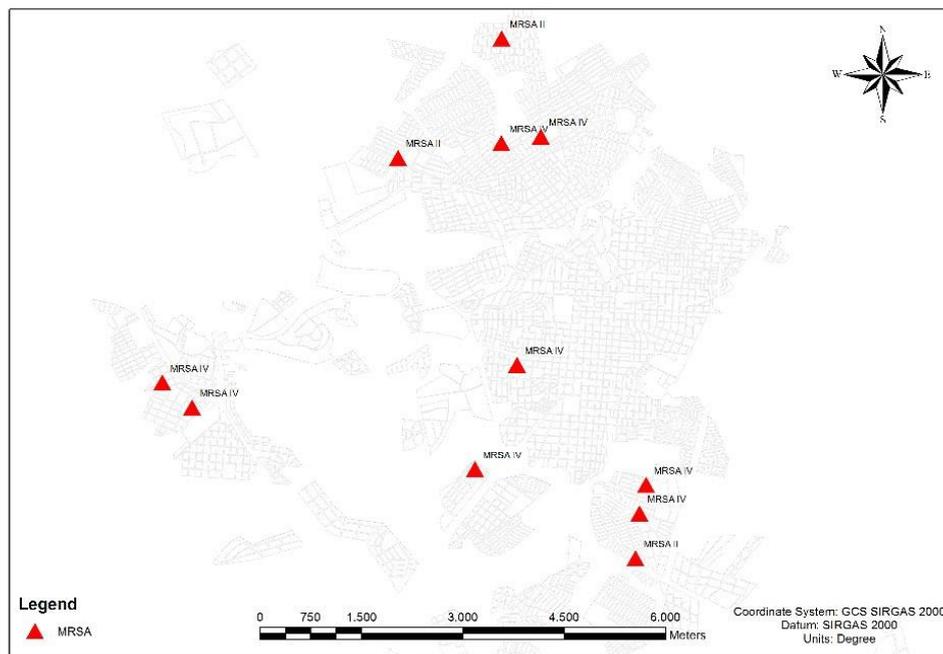


Figura 2: Distribuição espacial aferida pela aplicação do estimador Kernel.





## DISCUSSÃO

A maioria dos MRSA encontrados nesse estudo apresentaram SCC*mec* tipo IV, Complexo Clonal (CC) 5 (ST5 e ST1176), PVL<sup>-</sup> e spa t002. Esses resultados concordam com os achados de estudo de base populacional realizado na cidade de Botucatu no ano de 2011, que objetivou identificar a prevalência de *S. aureus* em portadores nasais e demonstrou 0,9% de MRSA, todos SCC*mec* tipo IV e PVL<sup>-</sup>, maioria ST5 e ST1176 e spa t002 (Pires et al, 2014). O ST1176 foi descrito pela primeira vez em *S. aureus* SCC*mec* IV em um estudo realizado no Hospital São Paulo, na cidade de São Paulo, Brasil, indicando que esse novo clone (ST1176) pode estar emergindo em infecções comunitárias e nosocomiais no Brasil (Carmo et al, 2011). MRSA SCC*mec* tipo IV, ST-5, CC5 também foi isolado de culturas de sangue e aspirado traqueal de um jovem de uma pequena cidade do interior, próxima de Botucatu (Bofete, com cerca de 9000 habitantes) que não tinha histórico de exposição a cuidados de saúde ou viagem recente e apresentou trauma após uma partida de futebol que evoluiu para celulite, abscesso local, pneumonia e sepse grave (Camargo et al., 2013). Todos esses relatos demonstram a predominância de ST5 e CC5 em Botucatu e região. Segundo Rodriguez-Noriega et al. (2010) 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. O principal cluster formado em nosso estudo caracterizou-se pela similaridade

de doze isolados de MSSA ST1635, pertencentes a onze pacientes que foram atendidos em nove das 17 UBSs do município. O ST1635 apresenta diferença do ST5 apenas no gene *aroE*, portanto também pertence ao CC5.

Nossos resultados revelaram um isolado de MRSA SCC*mec* IV, ST8/t008/IV/PVL<sup>-</sup> que apresentou similaridade no PFGE com o clone USA300. Esse é o clone mais encontrado nos Estados Unidos e também foi encontrado no Brasil por Miranda et al. (2007) em estudo realizado no Recife e no Rio de Janeiro. Também encontrou-se isolados de MRSA SCC*mec* IV e SCC*mec* II, ambos ST5 e uma linhagem MSSA mostrando agrupamento no PFGE com o clone internacional USA 800. Em 2002, Enright et al. (2002) analisaram uma coleção internacional de *S. aureus* isolados de hospitais e adquiridos na comunidade tipados por SCC*mec* e MLST. A análise revelou novas informações sobre grupos clonais de *S. aureus*. Curiosamente, a comparação das sequências de nucleotídeos de MRSA e MSSA incluída no CC5 permitiu o estabelecimento de um ancestral comum de MSSA. Diferentes isolados MRSA teriam se originado a partir desse ancestral MSSA por eventos distintos de aquisição de SCC*mec*.

Embora nossos resultados não tenham revelado a presença de MRSA ST30, três MSSA ST30 identificados apresentaram 100% de similaridade no PFGE, sendo um PVL<sup>+</sup> e dois TSST-1<sup>+</sup>, e coletados em UBSs distintas. *S. aureus* ST30-MRSA-IV provavelmente surgiram por uma recente introdução de SCC*mec* tipo IV para o sucedido clone ST30-MSSA. Ribeiro et al. (2005)

descrevem os primeiros casos de infecção por CA-MRSA na América do Sul. Os isolados de MRSA foram obtidos de dois pacientes que apresentavam infecção de pele e tecidos moles, e de outro paciente que apresentava artrite séptica. Os três pacientes eram provenientes da comunidade, sem fatores de risco associados ao isolamento de MRSA, hospitalização ou cirurgia no ano anterior ao isolamento de MRSA ou presença de dispositivos percutâneos no momento da cultura. Estes três casos foram classificados como infecções comunitárias. As amostras foram obtidas entre junho de 2002 a setembro de 2003 no ambulatório de dois hospitais diferentes localizados na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os isolados eram carreadores de SCC*mec* IV e apresentaram padrões idênticos aos do clone ST-30 (Oceania Sudoeste do Pacífico).

Todos os *S. aureus* de nosso estudo apresentaram ao menos quatro dos 13 genes de virulência pesquisados. Nas diversas análises realizadas não foi verificada associação entre a presença dos genes de virulência com a presença de resistência à meticilina, origem do isolado (nasal ou ferida) ou tipo de cassete cromossômico (II ou IV). Os genes para hemolisinas e biofilme foram presentes em quase todos isolados. Entretanto não identificou-se positividade para nenhuma esfoliatina. Li et al. (2012) também verificaram alta frequência dos genes *hla* e *hlb* e baixa detecção dos genes *eta* e *etb* em *S. aureus* isolados de hemoculturas e infecções de pele em crianças atendidas em um hospital chinês. Estudos com modelos experimentais inoculados com CA-MRSA

USA300 tem mostrado o envolvimento do gene *hla* que codifica a hemolisina alfa no desenvolvimento de infecções graves, incluindo pneumonia, osteomielite e bacteremia (Wardenburg et al., 2008; Crémieux et al., 2013).

A formação de biofilme tem grande importância no tratamento de feridas, retardando sua cura. Neste estudo a presença do gene *icaA* foi de 100% e de *icaD* foi de 95%. Arciola et al. (2001) encontraram 61% dos genes *icaA* e *icaD* em isolados clínicos de *S. aureus*. A aderência, invasão de células epiteliais humanas e acúmulo de grande quantidade de biofilme contribui para o fitness das linhagens de MRSA mais bem sucedidas em todo o mundo (Amaral et al., 2005). Quanto às enterotoxinas foi predominante a presença de *sea*, seguido pela *sec*, *seb* e apenas um isolado *sed* +. Vianello et al. (2006) também encontraram resultados semelhantes em *S. aureus* isolados de amostras clínicas de hospitais da cidade de São Paulo-SP: 40,5% de *sea*, 34,3% de *sec*, 18,9% de *seb*, e 5,5% de *sed* e nenhum *see* positivo. O gene da TSST-1 foi identificado em 5% dos isolados de *S. aureus*, todos sensíveis a metilina, achados semelhantes aos encontrados em outros estudos (Djahmi et al., 2013; Bonesso et al., 2014). A baixa frequência do gene da PVL também tem sido verificada em outros estudos realizados na região (Pires et al. 2013; Bonesso et al., 2014; Witzel et al., 2014).

Apesar da coleta de swabs nasais terem sido realizadas apenas em 48 dos 88 pacientes incluídos neste estudo, a análise dos resultados demonstra uma forte relação entre carrear o mesmo tipo clonal em nariz e ferida

simultaneamente. Os resultados revelaram 11(23%) dos isolados de *S. aureus* nasais idênticos aos encontrados na ferida, sendo que dois pacientes apresentaram o mesmo clone MRSA em ambos locais. Outro interessante achado foi a mudança do perfil clonal dos isolados de *S. aureus* verificado na segunda coleta do mesmo paciente. Somente dois dos seis pacientes acompanhados apresentaram o mesmo clone em todas as coletas.

De acordo com a distribuição espacial de Kernel os territórios abrangentes das UBSs Cecap, Jd. Iolanda e Cohab I apresentaram maior densidade para presença de *S. aureus*, todas regiões periféricas e distantes uma das outras. Foram UBSs de maior demanda de curativos, e conseqüentemente, os locais onde se realizaram maior número de coletas. Pode-se pensar que devido a maior prevalência de infecções causada por *S. aureus*, aumenta-se o risco de transmissão do agente, e assim há um maior número de pacientes sendo assistidos por essas unidades.

Como limitações deste estudo podemos citar o design transversal que não permitiu o acompanhamento desses pacientes, o que possibilitaria uma melhor investigação da evolução dos perfis clonais e disseminação, a ausência de dados de isolamento e identificação de outros micro-organismos presentes, já que é sabido que as feridas apresentam, muitas vezes, colonização polimicrobiana (Gjødsbøl et al., 2006); a difícil diferenciação entre infecção e colonização de feridas crônicas que ainda é muito questionada na literatura científica; e a ausência de coleta nasal em todos os participantes do estudo.

Entretanto este é o primeiro estudo que avalia a presença de clones através de UBS no Brasil. Nossos resultados mostram desde a possível contaminação ferida x nariz até a transmissão entre pacientes da mesma UBS e entre UBS distintas e geograficamente distantes entre si, o que nos fazemos questionar sobre os meios de transmissão que podem ser desde o carreamento deste agente pelos profissionais de saúde envolvidos no atendimento desses pacientes ou fatores relacionados ao ambiente.

## REFERENCIAS

- Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM 2005. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. **J Infect Dis** 2005; 192: 801-810.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J Clin Microbiol** 2001; 39(6): 2151-2156.
- Bonesso MF, Marques SA, Camargo CH, Fortaleza CMCB, Cunha MLRS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non outbreak skin infections. **Braz J Microbiol** 2014;4:1401-1407.
- Caiaffa-Filho HH, Trindade PA, Cunha PG, Alencar CS, Prado GVB, Levin AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was

- more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2013; 76:518-520.
- Carmo MS et al. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. **Braz J Med Biol Res** [online] 2011;44(10):1013-1017.
- Camargo CH, Cunha MLRS, Bonesso MF, Cunha FP, Barbosa NA, Fortaleza CMCB. Systemic CA-MRSA infection following trauma during soccer match in inner Brazil: clinical and molecular characterization. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2013; 76(3): 372-4.
- Consensus Development Conference on Diabetes foot wound care: 7-8 april 1999, Boston, Massachusetts. American Diabetes Association. **Diabetes Care** 1999;22:1354-1360.
- Crémieux AC, Saleh-Mghir A, Danel C, Couzon F, Dumitrescu O, Lilin T, Perronne C, Etienne J, Lina G, Vandenesch F.  $\alpha$ -hemolysin, not Panton-Valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. **J Infect Dis** 2014; 209.
- Djahmi N, Messad N, Nedjai S, Moussaoui A, Mazouz D, Richard JL, Sotto A, Lavigne JP. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. **Clin Microbiol Infect** 2013; 19:E398-E404.
- Douglas M, Davis Jr. CA, Fonseca FT. Geocodificação de endereços urbanos com indicação de qualidade. **Proceedings XIII GEOINFO** 2012; 36-41.

Enright MC, Day NPJ, 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): 1008–1015.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc Natl Acad Sci** 2002;99(11):7687-92.

Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **Int Wound J** 2006; 3: 225-231.

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(3):426-430.

Koneman EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr, WC. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.

Levine NS, Lindberg RB, Mason Jr. AD, Pruitt Jr. BA. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wound. **J Trauma** 1976;16(2):89-94.

Li T, Yu X, Xie J, Xu Y, Shang Y, Liu Y, Huang Y, Qin Z, Parsons C, Hu L, Salgado L, Wang L, Yu F. Carriage of virulence factors and molecular

characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream, and skin and soft tissue infections in children. **Epidemiol Infect** 2012; 1-5.

Marconi C, Cunha MLRS, Araújo 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** 2005; 11(2): 117-128.

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; 6: 618-23.

Martins MA, Tipple AFV, Reis C, Santiago SB, Bachion MM. Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. **Cienc Cuid Saude** 2010; 9(3): 464-470.

Martins MA, Santos SLV, Leão LSNO, Araújo NP, Bachion MM. Prevalence of resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative isolates of venous ulcers of primary healthcare patients. **Rev Soc Bras Med Trop** 2012; 45: 717-722.

Martins EAP, Meneghin P. Avaliação de três técnicas de limpeza do sítio cirúrgico infectado utilizando soro fisiológico. **Cienc Cuid Saude** 2012; 11(suplem.):204210.

McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR, Levett PN, Horsman GB. Development of a triplex Real Time PCR assay for detection of Pantón-Valentine Leukocidin toxin genes in clinical

- isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol** 2005; 43(12): 6147-49.
- 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.
- Milheiro C, Oliveira DC, Lencastre H. Update to the Multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 2007; 51(9): 3374-3377.
- Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, Vidal CFL, Figueiredo MAS. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. **Clin Microbiol Infect** 2007; 13(12):1165-72.
- Okuma K, Iwakama K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, et al. Dissemination of new Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J Clin Microbiol** 2002; 40(11): 4289-4294.
- Pereira EPL, Cunha MLRS. Avaliação da Colonização nasal por *Staphylococcus* spp. Resistente a oxacilina em alunos de enfermagem. **J Bras Patol Med Lab** 2009; 45(5): 361-369.

Pereira VC, Riboli DFM, Cunha MLRS. Characterization of the clonal profile of MRSA isolated in neonatal and pediatric intensive care units of a University Hospital. **An Microbiol Antimicrob** 2014; 13: 50.

Pires FV, Cunha MLRS, Abraão LM, Faccioli-Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CMCB. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *Plos One* 2014; 9(3): e92537. doi:10.1371/journal.pone.0092537

Rodrigues-Noriega E e Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Braz J Infect Dis** 2010;14(2): 87-96.

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;37:3556–3563.

Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. **J Infect Dis** 2003; 188: 730-7.

Vianello MA. Caracterização genotípica dos fatores de virulência e seu regulador agr em cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP 2006, São Paulo.

Wardenburg J, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, Schneewind O, de Leo FR. Panton Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine

models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. **J Infect Dis** 2008, 198: 1166-1170.

Witzel CL, Fortaleza CMCB, Souza CSM, Riboli DFM, Cunha MLRS. Nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* among imprisoned males from Brazil without exposure to healthcare: risk factors and molecular characterization. **Ann Clin Microb Antimicrob** 2014; 13: 25.

Wound infection in clinical practice. An international consensus. **Int Wound J** 2008; 5(suppl 3): iii-11.

#### 4. CONCLUSÕES

- ✓ A prevalência de *S. aureus* e MRSA nos isolados de feridas e narinas de pacientes assistidos por UBS do município de Botucatu-SP foi de 51,5% e 8,7%, respectivamente;
- ✓ SCC*mec* tipo IV foi predominante nos MRSA isolados, seguido pelo SCC*mec* tipo II;
- ✓ Todos os isolados de *S. aureus* foram sensíveis ao sulfametoxazol/trimetoprim, ácido fusídico, tigeciclina, quinupristina/dalfopristina, linezolida e vancomicina.
- ✓ A resistência à levofloxacina apresentou associação positiva com resistência à oxacilina;
- ✓ Não houve associação entre a presença de genes de virulência com resistência à oxacilina ou SCC*mec* Tipo IV ou Tipo II. Os genes codificadores de hemolisinas e biofilme foram identificados em mais de 90% dos isolados. Não identificou-se positividade para enterotoxina E e esfoliatinas A, B e D.
- ✓ Dentre os genes codificadores de enterotoxinas, *sea* e *sec* foram os mais prevalentes;
- ✓ O gene da TSST-1 e da PVL foram encontrados somente em MSSA;

- ✓ Houve associação entre o carreamento nasal de *S. aureus* ou MRSA com a presença do mesmo na ferida e 11 (15%) dos 74 pacientes com coletas nasais e de feridas, apresentaram o mesmo perfil clonal;
- ✓ A maioria dos pacientes com mais de uma coleta em momentos distintos apresentou cepas diferentes.
- ✓ O PFGE agrupou os isolados de *S. aureus* em oito clusters e o maior foi formado apenas por isolados de MSSA ST1635, coletados de nove UBSs diferentes;
- ✓ Houve agrupamento entre as amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes diferentes coletados da mesma UBS, assim como coletados de unidades distintas e distantes uma das outras;
- ✓ A maioria dos isolados de *S. aureus* pertencem ao CC5: ST5, ST1176, ST1635 e spa t002;
- ✓ O carreamento de *S. aureus* apresentou associação negativa com a idade, uso prévio de ciprofloxacina e de amoxicilina e associação positiva com o uso prévio de benzilpenicilina;
- ✓ Não foram encontrados fatores associados com a aquisição de MRSA; A distribuição espacial de Kernel demonstrou maior densidade de isolados de *S. aureus* no território das UBSs: Cecap, Jd. Iolanda e Cohab I.

## 6. ANEXOS

### 6.1 *Questionário*

UBS: \_\_\_\_\_

Data coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

#### 1. Dados pessoais:

Nome: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_ Sexo: \_\_\_

Tel.s: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

#### 2. Condições socioeconômicas:

A. Renda familiar mensal: \_\_\_\_\_

B. Moradia ( ) própria ( )alugada ( )outro \_\_\_\_\_

C. n° de pessoas na casa: \_\_\_\_\_

D. Água tratada ( ) sim ( ) não

E. Esgoto tratado ( ) sim ( ) não

F. Rua asfaltada ( ) sim ( ) não

G. Luz elétrica ( ) sim ( ) não

H. Zona Rural ( ) Zona urbana ( )

I. Nos últimos 12 meses foi admitido em alguma instituição abaixo?

( ) Clínica de repouso/reabilitação

( ) Asilo

Presídio

Tiro de guerra

Time esportivo

Nenhuma

J. Pratica algum esporte?  sim  não ; Qual? \_\_\_\_\_

L. Faz uso de drogas ilícitas?  sim  não

M. Alcoolismo  sim  não; Tabagismo  sim  não

N. Possui animal de estimação?  não  sim, Qual(s)? \_\_\_\_\_,

### 3. Histórico:

A. Você já teve alguma infecção anterior que necessitou de tratamento com antibiótico(s)?

Não  Sim, Qual(is) antibiótico(s) foi(ram) utilizado(s)? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

B. Você possui alguma dessas patologias?

Diabetes, tipo\_\_\_;  Pressão alta;  Colesterol alto;  outros \_\_\_\_\_

C. Como surgiu sua(s) ferida(s)? \_\_\_\_\_

Quanto tempo ela(s) tem? \_\_\_\_\_, É de repetição?  sim  não

D. Fez  e/ou faz  uso de antibióticos devido à ferida?  sim  não;

Há quanto tempo foi o último uso? \_\_\_\_\_

Qual(is) usou? \_\_\_\_\_

E. Fez exames microbiológicos?  sim  não, Qual(s) \_\_\_\_\_

F. Já foi internado alguma vez na vida? ( )sim ( )não

Quanto tempo faz desde a última internação?\_\_\_\_\_ motivo:\_\_\_\_\_

G. Tipo de ferida:

( ) úlcera arterial ( ) pé-diabético

( ) úlcera venosa (estase) ( ) úlcera de pressão

( ) úlcera mista ( ) Queimadura

( ) Outras\_\_\_\_\_

**4. Características da Ferida(s):** *(Será preenchido pelo pesquisador)*

( ) Edema ( ) Eritema ( ) Calor ( ) Dor ( ) Secreção purulenta ( ) Febre ( ) outra\_\_\_\_

Cobertura em uso:\_\_\_\_\_ Tempo de uso:\_\_\_\_\_

Sítio anatômico:\_\_\_\_\_

Tamanho:\_\_\_\_\_

Aspecto/descrição:\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Foto: ( )S ( )N

## 6.2 *Termo de Consentimento Livre Esclarecido para Participação em Pesquisa científica*

CONVIDO você a participar do Projeto de Pesquisa intitulado: “Epidemiologia Molecular e estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu”, que tem como objetivo verificar se sua ferida possui uma bactéria chamada *Staphylococcus aureus*. Essa bactéria é muito encontrada em feridas, causa grandes infecções, principalmente, dentro dos hospitais, também é facilmente transmitida para outras pessoas e possui grande capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Isso faz com que o tratamento e a cura da ferida se tornem mais difíceis.

Para você participar, você terá que permitir que a pesquisadora faça uma limpeza de sua ferida com soro fisiológico, removendo as possíveis sujidades e, depois, com um swab (que parece um cotonete), realize um esfregaço pressionando levemente a ferida. Após a conclusão do trabalho todas as amostras isoladas dos pacientes serão mantidas congeladas. Você terá que responder um questionário contendo perguntas sobre seus dados de identificação (idade, sexo, ocupação, etc.), condições socioeconômicas (renda familiar, saneamento básico, etc.), história de sua saúde (doenças, infecções, etc.) e de sua ferida (origem, tratamento, etc). Também pedimos permissão para tirar foto de sua ferida.

A sua participação neste estudo contribuirá para o maior conhecimento sobre essa bactéria e seus mecanismos de resistência, permitindo assim a busca por melhorias no tratamento e cura de feridas.

Suas informações serão utilizadas somente no projeto de pesquisa e sua identidade será mantida em sigilo. A pesquisadora estará disponível para responder quaisquer perguntas e você poderá retirar sua participação no estudo, a qualquer momento.

Botucatu, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Pesquisadora: Eliane Patricia Lino Pereira Franchi

DECLARO que fui satisfatoriamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, e concordo em participar da mesma, permitindo a coleta de material da(s) minha ferida(s) com um swab, respondendo as perguntas apresentadas no questionário e permitindo que fotografem minha ferida. Por estar de acordo, assino este presente termo.

Botucatu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Ass. do Sujeito à Pesquisa

Ass. (pais ou responsável legal)

Ass. testemunha (caso analfabetismo)

Esclarecimentos adicionais poderão ser obtidos com a pesquisadora pelo telefone: 3811- 6058

Endereço e telefone do pesquisador: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3811-6058/ 14-81448987; fliane24@yahoo.com.br.

Endereço e telefone da orientadora: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3811-6058; cunhamlr@ibb.unesp.br.

1ª via – arquivo; 2ª via – sujeito da pesquisa

### 6.3 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, 06 de abril de 2009.

Of. 89/09-CEP

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

Prezada Prof.<sup>a</sup> Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3127-2009) "Caracterização da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de feridas de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Botucatu", a ser conduzido por Eliane Patrícia Lino Pereira, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06/04/2009.

Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.



Botucatu, 01 de agosto de 2011.

Of. 333/11-CEP

Ilustríssima Senhora  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Departamento de Microbiologia e Imunologia do  
Instituto de Biociências de Botucatu

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

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 3958-2011) "Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Botucatu", a ser conduzido por Eliane Patrícia Lino Moreira, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Maria Rachel Nogueira Barreira e Natalia de Sousa Lima Moreira da Costa, recebeu do relator, parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 01 de Agosto de 2.011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.