



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

Lígia Maria Abraão

**CARREAMENTO NASAL/ORAL DE *Staphylococcus aureus*
EM POPULAÇÕES INDÍGENAS DO NORTE E SUDESTE DO
BRASIL: RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, VIRULÊNCIA,
FATORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor(a) em Doenças
Tropicais

Orientador: Prof^ª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Co-orientador: Prof^º. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

**Botucatu
2017**

Lígia Maria Abraão

CARREAMENTO NASAL/ORAL DE *Staphylococcus aureus* EM POPULAÇÕES INDÍGENAS DO NORTE E SUDESTE DO BRASIL: RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, VIRULÊNCIA, FATORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

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

Orientador: Prof^ª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Co-orientador: Prof^º. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu
2017

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

Abraão, Lígia Maria.

Carreamento nasal/oral de *staphylococcus aureus* em populações indígenas do norte e sudeste do Brasil : resistência antimicrobiana, virulência, fatores de risco e epidemiologia molecular / Lígia Maria Abraão. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Capes: 40101096

1. Epidemiologia molecular. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 4. Mucosa nasal. 5. Nativos. 6. Virulência (Microbiologia). 7. Fatores de risco.

Palavras-chave: Colonização Nasal/Oral; Epidemiologia molecular; MRSA; Populações indígenas.

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece." (Benjamin Disraeli)



A minha família (Minha Mãe Mara e irmãos, Aline e Guilherme), por todo amor, carinho e pelo apoio em todas as horas. Em especial, a minha mãe, pelo suporte inigualável, pelo cuidado, pelo amor incondicional e pela compreensão de sempre. A minha caminhada só tem sido possível, porque vocês são o alicerce que me sustenta.

Ao meu pai, Mário Augusto (in memoriam)

De quem eu sinto tanta falta... Obrigada por ter sido meu pai, por ter me apoiado e me amado ao longo de toda sua vida! Obrigada por ter permanecido firme nos momentos difíceis, o que nos tornou pessoas mais perseverantes.

A família Medeiros de Souza: Dona Aparecida, Sr. Edilmar e Rodrigo.

Obrigada pela forma tão acolhedora com a qual me receberam e pelo cuidado que tiveram comigo ao longo dos 3 meses que permaneci em Cruzeiro do Sul – Acre. Esse trabalho não teria sido possível sem o apoio de vocês. Vocês são muito especiais!

A Deus, centro de todas as coisas, centro da minha vida e razão do meu existir! Obrigada pela forma surpreendente com a qual tem agido em minha vida, obrigada por me sustentar e me permitir sempre a crer no melhor, mesmo quando tudo parece contrário.

A minha querida Mãe Mara, por ser a melhor mãe que eu poderia ter! Por acreditar em mim, por ser minha melhor amiga, por me encher de amor mesmo estando longe. Você é um exemplo para mim, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Aline e Guilherme, por serem tão especiais comigo, pelo amor, pelo auxílio e cuidado de sempre. Pelo apoio e por me proporcionarem tantos momentos de alegria, descontração e diversão. Tenho orgulho de ser irmã de vocês!

À minha Avó Irene, pelo amor, cuidado, carinho e preocupação. Pelo suporte que sempre me oferece, pelo exemplo vivo de amor ao próximo que me dá com suas ações diárias.

À minha Tia Guinha (Ana) pelo carinho, pelas orações constantes e por acreditar na realização dos meus sonhos.

À Família Shallom, pela convivência, aprendizado, suporte. Pelo crescimento que me proporcionaram ao longo desses anos, pela torcida, pelas incansáveis orações.

Aos meus queridos amigos (de longas e curtas datas): Cris Naves, Joseana, Fernanda Catane, Anita, Manuel Mário & Joice, Juliana, Maria Rachel, Domingos, Carol, Gustavo e Amanda, entre outros também especiais. Obrigada pelo bem que me proporcionam através dessa amizade especial, pelo companheirismo, carinho, apoio, auxílio nos momentos difíceis. Enfim, obrigada por tudo que vivenciamos. Vocês são muito especiais!

À equipe da CCIRAS do Hospital Unimed Botucatu (Dra. Sandra, Dr. Paulo e Fabiana). Obrigada pela oportunidade, pelo imenso aprendizado que fez toda a diferença em minha vida e pela compreensão ao longo da construção desse trabalho. Em especial a Dra. Sandra, pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo crescimento profissional e pessoal que me proporcionou ao longo dessa trajetória.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pelo aprendizado, pelas experiências e pelo suporte que me impulsionaram e capacitaram a seguir em frente. Em especial à Profa. Semíramis que tanto me apoiou e incentivou ao longo da realização desse trabalho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Profa. Alexandrina, um exemplo de pró-atividade e competência! Obrigada por todo auxílio, suporte e preocupação ao longo desse trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Lurdinha, pela oportunidade que me deu de fazer parte dessa equipe tão dedicada e competente, pelo apoio, pelo crescimento proporcionado, por ter acreditado que eu poderia dar bons frutos! Você é um exemplo de garra, determinação e perseverança... é um privilégio fazer parte dessa equipe!

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Magno, por todo suporte, pela confiança, pela paciência, pelo aprendizado que me proporciona sempre! Obrigada pela ajuda com as análises estatísticas e pelo estímulo que tem me dado ao longo desses anos. Você é um profissional que tenho como referência.

Ao Prof. Rodrigo Medeiros, colaborador desse projeto. Muito obrigada por ter entrado nessa empreitada com todo entusiasmo e dedicação! Obrigada pelo suporte, pelo acolhimento, pelo aprendizado. Esse trabalho não teria caminhando sem o auxílio de vocês.

Ao Jairo, indigenista de Cruzeiro do Sul-Acre, obrigada por todo suporte e pelas tramitações com os indígenas.

Aos grupos indígenas que participaram desse estudo, pela abertura que nos deram, por compartilharem um pouco da história e cultura indígena e por nos permitirem realizar essa pesquisa tão diferenciada.

Aos meus amigos e colegas Laboratório de Bacteriologia: Adilson, Ayrir, Ana Cláudia, Camila, Danilo, Eliane, Katheryne, Luiza, Natália, Priscila, Taís Donegá, Thais Alves, Yohana e Felipe, por toda ajuda dispendida, pela amizade, pelo companheirismo, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelo aprendizado mútuo ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Em especial a Thais, por toda ajuda ao longo de todos esses anos (e que ajuda), pela amizade, pela parceria!

Aos amigos Carlos e Mariana, vocês são além de especiais! Obrigada pela amizade, companheirismo, e pelo suporte de sempre, aprendo constantemente com vocês!

Ao Adriano Martison, por todo auxílio e contribuição.

Aos funcionários, alunos e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela assistência, pelo carinho e pela prontidão com a qual prestam os serviços.

Aos Funcionários do Departamento de Doenças Tropicais (Michele e Júlio) pela simpatia, atenção e por todo auxílio prestado.

À Seção técnica de Pós-Graduação pela atenção com as quais recebem os alunos, pela prontidão em sanar dúvidas e por todo serviço prestado.

À Bruna, secretária do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pela simpatia de sempre, pela atenção e preocupação, pela paciência, e por todo auxílio despendido ao longo desse período.

À Banca do Exame Geral de Qualificação composta pelo Dr. Carlos Henrique Camargo e Dr. Ricardo Cavalcante, pelas pertinentes colocações e sugestões, que contribuíram diretamente para melhoria do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro prestado.

À equipe do SCIH do Hospital Alemão Oswaldo Cruz (Dr. Ícaro, Cris Schmitt, Márcia e Paulinha) pelo aprendizado constante, pelo apoio e compreensão dos meus momentos de ausência nesse processo de finalização do trabalho. Vocês são incríveis, é uma honra fazer parte dessa equipe!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o alcance de mais essa etapa em minha vida. Obrigada!

Breve experiência em terras indígenas

Desde o delineamento dessa pesquisa, sabia que essa seria uma missão bastante difícil. No entanto, era certo que essa tarefa viria acompanhada de experiências incríveis e de um aprendizado imensurável. Realmente não foi diferente, trabalhar com populações indígenas foi uma oportunidade enriquecedora, os indígenas possuem hábitos e costumes distintos, apresentam uma cultura única e uma dinâmica de vida extremamente peculiar.

Ao longo de toda essa trajetória, surgiram muitos desafios, dos quais gostaria de compartilhar alguns. A tramitação ética com populações especiais é extremamente difícil e demorada, exigindo o envolvimento de diversas frentes, inúmeras autorizações, negociações prévias. Mas, com muita perseverança, tudo foi possível!

Quanto à experiência em terras indígenas, certamente daria para escrever um livro com todas as vivências. Começamos as coletas no município de Arai, distrito de Bauru. As coletas eram programadas aos finais de semana, de modo que isso já tivesse combinado previamente. Transportávamos todo material necessário: swabs, solução fisiológica, os questionários para entrevista, entre outros. Normalmente, nos reuníamos em escolas (nas próprias aldeias) e os indígenas se dirigiam até o local de coleta. Fato interessante, era que, com aprovação e incentivo do Cacique, tudo caminhava muito bem. Foram longos dias de coletas, que normalmente eram sem parada para aproveitar o fluxo e otimizar o trabalho. Para realização das coletas em Arai (2 aldeias), contei com o apoio das Enfermeiras, amigas e parceiras de Laboratório, Eliane e Thaís, que fizeram toda a diferença.

Já no Acre, o cenário mudou completamente. Enquanto em Bauru o acesso era via terrestre, em Cruzeiro do Sul, um dos municípios do estudo, além do acesso via terrestre (com estradas totalmente acidentadas) era necessário um trajeto pelos rios para conseguir acessar as aldeias. Embora Cruzeiro do Sul tenha sido uma das áreas do estudo, também trabalhamos nos municípios adjacentes: Mâncio Lima e Feijó.

A programação das coletas dependia da disponibilidade e autorização dos Caciques. Trabalháramos acompanhando rotina de cada aldeia. Nessa circunstância, precisávamos pensar na logística de transporte, aluguel de barco, barqueiro, compra de combustível. Transportávamos além dos materiais, alimentos (para consumo próprio), protetor solar, guarda-chuvas, e um estoque de repelente (que nem sempre dava conta dos famosos "Diúns", que fazem dos "borrachudos" seres quase insignificantes).

Quando as coletas eram em Cruzeiro do Sul, nos programávamos para passar o dia na aldeia, retornando no final da tarde. Acordávamos cedo, percorríamos um trajeto em terra e depois era o momento de subir o Rio. O estado do Acre é cercado de Tgarapés de diversos tamanhos e profundidades. A distância entre as aldeias era variável, o tempo médio

para subir o rio era cerca de 1 hora ou mais, já para descer, era possível conseguir dentro de 40 minutos. Detalhe importante, tudo ficava mais difícil caso chovesse e no Acre, isso acontece todo final de tarde.

Para as coletas realizadas em Feijó (quase 300 km de Cruzeiro do Sul), era necessário passar o dia na cidade. A logística era a mesma, porém no final do dia retornávamos para a cidade e ficávamos hospedados em uma pousada. Foram 10 aldeias percorridas entre as diferentes etnias estudadas. Entre o calor de 40 graus, as caminhadas nas matas e as intensas pancadas de chuvas, coletamos amostras de mais de 400 indígenas. Logo após as coletas, as amostras eram devidamente acondicionadas e enviadas ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Biociências - IBBS, UNBOL de Botucatu. Permaneci na região um pouco mais de 3 meses, para conseguir finalizar o trabalho.

Foram momentos extremamente ricos, de muito aprendizado, com uma miscelânea de aventuras, novas experiências e muitas descobertas acerca dos povos indígenas. Se um dia tiver oportunidade, quero voltar! Além de ser um campo vasto para estudos, trata-se de uma população que carece por um serviço de assistência em saúde mais consistente e eficaz.

No Acre, contei com a colaboração do Prof. Rodrigo da Universidade Federal do Acre, que além de colaborador, se tornou um grande parceiro e amigo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> : epidemiologia, patogênese, resistência antimicrobiana e relevância clínica.....	1
1.2.	Estudos sobre colonização/infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> em populações indígenas.....	7
1.2.1	Cenário Nacional.....	9
2	JUSTIFICATIVA.....	11
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	Objetivo Geral.....	12
3.2	Objetivos Específicos.....	12
4	METODOLOGIA.....	13
4.1	Local do Estudo.....	13
4.2	População do Estudo	14
4.3	Coleta de dados demográficos e clínicos.....	15
4.4	Coleta de espécimes microbiológicos.....	16
4.5	Identificação dos espécimes	16
4.6	Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos	17
4.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	17
4.8	Extração do DNA bacteriano	18
4.9	PCR – <i>Real Time</i>	18
4.9.1	Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à oxacilina	18
4.9.2	Detecção dos genes da Leucocidina Pantone Valentine	19
4.10	Caracterização do SCC <i>mec</i>	20
4.11	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>	20
4.12	Pesquisa de genes de virulência (toxinas estafilocócicas)	23
4.13	Detecção dos genes envolvidos na formação e adesão do biofilme	23
4.14	Tipagem molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> por MLST	23
4.14.1	Extração de DNA.....	23
4.14.2	Amplificação dos genes conservados para o MLST.....	23
4.14.3	Sequenciamento e análise do MLST.....	24
5	Análise <i>e-BURST</i>	25
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	25

7	ANÁLISE QUESTÕES ÉTICAS.....	25
8	RESULTADOS.....	26
9	DISCUSSÃO.....	45
10	CONCLUSÃO	52
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
12	ANEXOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das amostras por região e prevalência de carreamento por <i>S. aureus</i> entre sítios de colonização.....	26
Figura 2. Curva de <i>Melting</i> (Padrão) e corrida da reação do gene <i>mecA</i> no Real Time PCR – <i>Step One Plus (Applied Maths)</i>	28
Figura 3. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (<i>Bionumerics Applied Maths</i>) dos perfis PFGE - <i>SmaI</i> de 190 isolados de <i>S. aureus</i> e MRSA provenientes de indivíduos hígidos de populações indígenas no sudeste e norte do Brasil.....	35
Figura 4. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (<i>Bionumerics Applied Maths</i>) dos perfis PFGE - <i>SmaI</i> de isolados de <i>S. aureus</i> e MRSA dos principais clusters identificados entre as populações indígenas no sudeste e norte do Brasil.(<i>Dice; Optimization: 0.5 %; Tolerance:1.25 %</i>).....	37
Figura 5. <i>eBURST</i> de <i>S. aureus</i> baseado nos STs representados pelos isolados contidos no banco de dados on-line <i>S. aureus</i> MLST, incluindo os STs isolados de indígenas das populações do sudeste e norte do Brasil.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais síndromes infecciosas causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	1
Quadro 2. Diferenças entre MRSA e CA-MRSA.....	5
Quadro 3. Distribuição da população indígena estimada para o estudo.....	14
Quadro 4. Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>sau</i>	16
Quadro 5. Limites da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) para categorização de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Quadro 6. Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mecA</i>	19
Quadro 7. Oligonucleotídeos para a detecção dos genes da Leucocidina Panton-Valentine.....	19
Quadro 8. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de virulência.....	22
Quadro 9. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção do operon <i>ica</i> .	23
Quadro 10. Primers utilizados na amplificação dos 7 genes conservados.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação da susceptibilidade antimicrobiana pelos métodos de disco-difusão e <i>E-test</i> (Oxacilina e Vancomicina).....	27
Tabela 2. Distribuição dos genes de virulência entre os isolados de <i>S. aureus</i>	29
Tabela 3. Distribuição dos genes relacionados à produção de biofilme entre os isolados <i>S. aureus</i>	29
Tabela 4. Modelo de Regressão de Poisson para análise dos fatores de risco associados ao carreamento de <i>S. aureus</i>	40
Tabela 5. Resultados de análise univariada dos fatores de virulência (prevalência de genes) associada aos tipos de Etnias.....	43
Tabela 6. Resultados da análise univariada dos fatores de risco associados ao carreamento de <i>S. aureus</i> distribuídos por Etnias.....	44

Resumo

A origem racial representa um dos principais determinantes dos riscos de colonização e infecção por *Staphylococcus aureus*. Há algum tempo, comunidades indígenas têm se mostrado mais propensas em relação a tais riscos, apresentando linhagens de *S. aureus* com perfis distintos dos quais normalmente se encontram em populações não-nativas. Características peculiares entre diferentes populações, tais como viver em condições de superlotação, assistência em saúde prejudicada e condições precárias de higiene podem ser mais relevantes na patogênese de algumas formas de infecções por *S. aureus*. Deste modo, os indígenas inegavelmente se enquadram no grupo de risco para o carreamento de microrganismos resistentes, estando suscetíveis tanto à aquisição quanto à disseminação de infecções. O presente estudo objetivou a identificação da prevalência e de fatores de risco para carreamento nasal e oral de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (Methicilin-sensitive *Staphylococcus aureus* MSSA e Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA, respectivamente) em indígenas de comunidades do Norte e Sudeste do Brasil, avaliando a diversidade genética, disseminação, fatores de virulência e resistência antimicrobiana, associados às questões étnicas, demográficas, ambientais e comportamentais. Para tanto, foram coletadas amostras nasais e de orofaringe de 400 indígenas (116 da região sudeste e 284 da região norte) através de *swabs* estéreis e posteriormente elas foram semeadas em meio de cultura e identificadas pelos métodos tradicionais. Concomitantemente, foram levantados dados demográficos e clínicos dos sujeitos da pesquisa. Isolados de *S. aureus* foram submetidos a testes fenotípicos e genotípicos de suscetibilidade antimicrobiana e à caracterização do cassete cromossômico SCC*mec*. Para detecção dos genes de virulência, foi realizada a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR). A análise do perfil clonal se procedeu através da técnica *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE a fim de se identificar os clusters endêmicos na população. Com o intuito de se identificar grupos de genótipos relacionados, foi realizada a tipagem por *Multilocus sequence typing* – MLST. Os resultados evidenciaram taxa de prevalência geral de *S. aureus* de 47,6% (IC 95%: 42,64-52,64), enquanto que na região sudeste obteve-se um total de 43,1 % (IC 95% 33.94-52.62) e na região da Amazônia 49,4 % (IC 95% 43.50-55-45). Quando realizada a distribuição por sítios de colonização, as taxas foram 31,8% (IC 95%: 27,23 -36,82) de carreamento nasal e 25,7 (IC 95%: 21,53-30,55) oral. Em relação ao gene *mecA* de resistência à meticilina, 3 isolados foram positivos, sendo todos orais. Todas as amostras *mecA* positivas albergaram o SCC*mec* IV. Desse modo, a prevalência de MRSA no estudo foi de 0,7% (IC 95%: 0,19-2,37).

Nenhuma amostra resistente foi identificada na região sudeste. Tratando-se da detecção dos genes de virulência, pôde-se evidenciar maior percentual dos genes relacionados às hemolisinas *hla* 96,3 e *hld* 80,6% e dos genes associados à produção do biofilme *icaA* 82,2 e *icaD* 72,7%. A identificação do perfil clonal através da análise por PFGE evidenciou presença de 21 clusters (>80% de similaridade) entre as populações nativas de ambos os estados, nos quais 5 clones principais agruparam amostras tanto das populações do sudeste quanto da região amazônica. Quando realizada análise pelo MSLT, identificou-se prevalência do complexo clonal ST 5, o qual reuniu amostras tanto de MSSA quanto MRSA, o quê sugere uma provável origem comum. Os resultados epidemiológicos mostraram associação do fator etnia com prevalência de *S. aureus*. Esse trabalho traz dados pioneiros acerca da epidemiologia de *Staphylococcus aureus* e MRSA em meio aos indígenas brasileiros. A análise do perfil clonal impulsiona a elucidação de questões relacionadas ao processo de evolução da bactéria estudada, sugerindo uma provável origem comum entre as diferentes estirpes encontradas. Por fim, os resultados epidemiológicos permitem inferir que o fator etnia está relacionado à prevalência de *S. aureus* em populações humanas.

Palavras-chave: colonização nasal/oral, epidemiologia molecular, MRSA, populações indígenas.

Abstract

The racial origin is one of the main risk determinants of *Staphylococcus aureus* colonization and infection. For some time now, indigenous communities have been shown to be more prone to these risks as they present *S. aureus* strains different from those usually found in non-native populations. Culturally typical characteristics among different populations, such as overcrowded living conditions, lack of health assistance, and poor hygiene conditions can be more relevant to the pathogenesis of some *S. aureus* infections. Therefore, the indigenous people are definitively a risk group for the carriage of resistant microorganisms, and are susceptible to both acquisition and dissemination of infections. This study aimed to identify the prevalence and the risk factors for nasal and oral carriage of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* (MSSA and MRSA) in indigenous communities from the North and Southeast regions of Brazil by evaluating the genetic diversity, dissemination, virulence factors, and antimicrobial resistance associated to ethnic, demographic, environmental, and behavioral issues. To this end, nasal and oropharyngeal samples of 443 indigenous people (116 from the Southeast and 284 from the North) were collected with sterile swabs. Then, such samples were seeded in culture medium and identified by conventional methods. Meanwhile, clinical and demographic data from the subjects were collected. *S. aureus* isolates were phenotypically and genetically tested for oxacillin/methicillin susceptibility and the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) was characterized. The virulence genes identification was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR). The characterization of the clonal profile was performed by The Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) to identify the endemic clusters in the population. In order to identify clusters of related genotypes, Multilocus Sequence Typing (MLST) was performed. The results showed a general prevalence rate of *S. aureus* of 47.6% (CI 95%: 42.64-52.64), while in the Southeast region there was a total of 43.1% (CI 95%: 33.94-52.62) and in the Amazon region 49.4% (CI 95%: 43.50-55-45). When the colonization sites were distributed, the rates were 31.8% (CI 95%: 27.23-36.82) of nasal carriage and 25.7 (CI 95%: 21.53-30.55) of oral carriage. Regarding the *mecA* gene detection, 3 isolates were positive, being 3 oral isolates. All the positive *mecA* samples harbored the SCC*mec* IV. Thus, the prevalence of MRSA in the study was 0.7% (CI 95%: 0.19-2.37). No resistant sample was identified in the Southeast region. With the detection of virulence genes, a higher percentage of genes related to hemolysins *hla* 96.3 and *hld* 80.6% and genes associated with the production of biofilm *icaA* 82.2 and *icaD* 72.7% could be evidenced. The identification of the clonal profile through the characterization by

PFGE evidenced 21 clusters (>80% similarity) among the native populations of both states in which 5 major clones clustered samples both from the Southeast and from the Amazon. When the MSLT analysis was carried out, a prevalence of clonal complex ST 5 was identified, which clustered samples both from MSSA and MRSA, suggesting a probable common origin. The epidemiological results showed an association between the ethnicity factor and the prevalence of *S. aureus*. This study brings pioneering data about the epidemiology of *Staphylococcus aureus* and MRSA among Brazilian indigenous populations. The analysis of the clonal profile promotes the elucidation of questions related to the evolution process of the bacterium studied, suggesting a probable common origin among the different strains found. Finally, the epidemiological results allow us to infer that the factor ethnicity factor is related to the prevalence of *S. aureus* in human populations.

Keywords: nasal and oral colonization, molecular epidemiology, MRSA, indigenous populations

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*: epidemiologia, patogênese, resistência antimicrobiana e relevância clínica.

Staphylococcus aureus é um comensal humano versátil reconhecido como um dos principais agentes virulentos sendo capaz de causar um amplo espectro de infecções que se caracterizam pela variedade de apresentações clínicas, que incluem desde quadros localizados até doenças sistêmicas de alta letalidade.^(1,2) Embora seja considerado como o patógeno mais importante dentro do gênero, cerca de 15 das 52 espécies conhecidas de *Staphylococcus* são potencialmente patogênicas em humanos.⁽³⁾ Destaca-se globalmente como um agente etiológico de relevantes taxas de morbidade e mortalidade tanto no âmbito hospitalar quanto no comunitário.⁽⁴⁾

Dentre as principais síndromes infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus*, podemos elencar os 3 tipos descritos no quadro abaixo:

Quadro 1. Principais síndromes infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus*.

Tipos	Síndromes
Tipo I – Lesões superficiais	Infecções de pele e partes moles: foliculites, erisipelas, celulites
Tipo II – Toxinoses	Intoxicação alimentar
	Síndrome da pele escaldada
	Síndrome do choque tóxico
Tipo III – Condições sistêmicas potencialmente fatais	Endocardites, osteomielites
	Abscesso cerebral
	Pneumonias
	Meningites e bacteremias
	Infecções de sítio cirúrgico ^(1,5)

Do ponto de vista morfológico, espécimes de *Staphylococcus* spp. são cocos Gram-positivos que se agrupam em cachos (do grego, *staphilé* = cachos de uva). *S. aureus* diferencia-se dos demais membros do gênero pela produção da enzima coagulase, facilmente detectada em testes rotineiros.⁽³⁾ Seus reservatórios naturais são o homem e outros animais de

sangue quente. Apesar disso, *S. aureus* é capaz de sobreviver em superfícies inanimadas por um longo período de tempo. ⁽⁶⁾

Enquanto membro persistente da microbiota humana, esse potente patógeno encontra-se em diferentes sítios anatômicos, incluindo a nasofaringe. É capaz de se proliferar em qualquer parte do corpo humano e ser transmitido a outras pessoas suscetíveis ou animais, podendo, em certas circunstâncias, causar casos de infecção no próprio hospedeiro. ^(7,8)

A nasofaringe é considerada um nicho ecológico primário de colonização desse microrganismo. Sendo assim, entende-se por colonização o processo dinâmico em que a bactéria deve se anexar às superfícies do hospedeiro superando os componentes imunes e competindo com outros microrganismos comensais. O fenômeno da colonização, ou seja, o carreamento desse patógeno sem sinais clínicos ou interação imunológica, é uma propriedade biológica fundamental desse microrganismo, que tem sido identificada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções por *S. aureus* tanto na comunidade como nos hospitais. ⁽⁸⁻¹³⁾

A colonização por *S. aureus* tem início pouco após o nascimento e recorre diversas vezes ao longo da vida. ⁽¹⁴⁾ Aproximadamente um em cada três indivíduos sadios carregam *S. aureus* assintomaticamente em suas narinas sem qualquer doença associada. Logo, estima-se que 20% dos seres humanos carregem persistentemente essa bactéria na mucosa nasal e outros 30% o carregam de forma intermitente. ^(14,15)

Acredita-se que carreadores de *S. aureus* apresentem maiores riscos de adquirir infecção e presume-se que os mesmos sejam uma importante fonte de disseminação da bactéria entre os indivíduos. ⁽¹²⁾ Estudos revelam que indivíduos colonizados com uma grande carga bacteriana apresentam risco seis vezes maior de desenvolver infecção estafilocócica quando comparados a indivíduos não-carreadores ou com baixa carga bacteriana. ⁽¹⁶⁾

É necessário acrescentar que, embora a nasofaringe seja o local mais consistente de colonização por *S. aureus*, sendo indicado como o ambiente mais apropriado para *screening* com *swabs*, outros sítios extra-nasais também podem ser colonizados, como garganta, axilas, períneo e trato gastrointestinal. ^(2,12,15,17)

A patogênese do *S. aureus* é complexa e depende de diversos fatores associados à doença, os quais incluem a virulência do patógeno, a resistência antimicrobiana e a susceptibilidade do hospedeiro. ^(16,18,19) A multiplicidade de infecções causadas pelos *S. aureus* está relacionada a um arsenal de fatores de virulência que lhe garantem sucesso como colonizantes e agentes de infecção, permitindo a adesão desse microrganismo à superfície das células e a invasão ou evasão do sistema imune, causando efeitos tóxicos nocivos ao

hospedeiro. Esses fatores compreendem a expressão de inúmeras toxinas distintas, proteínas de adesão da parede celular, enzimas extracelulares e exotoxinas. ^(16,20) Estudiosos afirmam que o primeiro passo para a infecção por *Staphylococcus* é o processo de adesão à superfícies. ⁽²¹⁾ Este se inicia por meio da colonização mediada por diversas adesinas. Uma das principais classes de adesinas compreende as proteínas covalentemente ancoradas no peptidoglicano que se ligam ao plasma ou componentes da matriz extracelular, sendo denominadas coletivamente de componentes de superfície microbiana reconhecendo moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMS). ⁽¹⁾ Essas moléculas reconhecem componentes importantes do plasma como fibrinogênio, fibronectina e colágeno. Fazem parte dos MSCRAMMS a proteína A (SpA), as proteínas ligadoras da fibronectina (FnbpA e FnbpB), a proteína ligadora do colágeno e fator *clumping* (proteínas A e B). ⁽¹³⁾

Junto aos fatores supracitados, a formação de biofilme representa um importante fenótipo de virulência no estabelecimento de infecções crônicas. ⁽²¹⁾ Biofilmes são comunidades estruturadas de células bacterianas incorporadas por uma matriz polimérica auto-produzida capazes de se aderir tanto a superfícies vivas quanto inertes. Essas estruturas acabam dificultando o tratamento de infecções por conferir à bactéria resistência à ação dos antimicrobianos e contra o sistema imune do hospedeiro. ^(21,22)

Praticamente todas as cepas de *S. aureus* secretam um grupo de exoproteínas, tais como as exotoxinas e enzimas, incluindo as nucleases, proteases, lípases, hialuronidase e colagenase. A principal função dessas proteínas parece estar ligada a conversão do tecido local do hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. Existem as exoproteínas com atividade citolítica, dentre as quais destacamos as hemolisinas alfa, beta e delta e a Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). ⁽¹³⁾

Esta última a PVL, é classificada como um biocomponente de citolisina, capaz de formar poros nos leucócitos. Está associada a quadros de extensa necrose tecidual e é responsável por infecções de pele graves e pneumonias necrotizantes. É encontrada principalmente em isolados de *S. aureus* resistentes à metilina adquiridos na comunidade. ^(13,16,23,24) Já as hemolisinas apresentam atividade citotóxica para os eritrócitos e leucócitos.

Adicionalmente às exotoxinas já descritas incluem-se a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas descritas e designadas pelas letras *SEA*, *SEB*, *SECn*, *SED*, *SEE*, *SEG*, *SEH*, *SEI*, *SER*, *SES* e *SET* e as toxinas esfoliativas. ^(13,25) Dentre essas, a TSST-1 e as enterotoxinas pertencem a um grupo de toxinas conhecidas como superantigênicas, caracterizadas especialmente por estimularem a proliferação de linfócitos T. A toxina 1 da síndrome do choque tóxico é um superantígeno associado a um quadro clínico

de febre alta, exantema e extravasamento de líquido em vasos capilares, resultando em hipotensão e edema, o que caracteriza a Síndrome do Choque Tóxico. ^(13,24) As enterotoxinas ingeridas em alimentos associam-se a quadros de intoxicação alimentar caracterizados por diarreias e vômitos. ^(25,26)

As esfoliatinas (ETA, ETB, ETD) determinam a clivagem de camadas profundas do epitélio, causando quadros de eritema e descamação disseminados, sendo possível afirmar que estão diretamente envolvidas com a Síndrome da Pele Escaldada ou lesões bolhosas (impetigo bolhoso). ^(24,25)

Recentemente foi identificada uma nova toxina através de proteômica de superfície celular em cepas de USA300. Tal toxina recebeu o nome de LukGH e apresenta atividade citolítica sobre os neutrófilos, assim como a PVL e as hemolisinas, representando potencialmente um novo fator de virulência. ⁽¹⁶⁾ Atualmente, um fato descoberto que se tem questionado é a relação causal entre a presença do gene codificador da PVL e a gravidade das infecções, visto que essa associação também está presente em quadros leves de infecção, existindo ainda, cepas de CA-MRSA invasivas que não são portadoras do gene. ⁽²⁷⁾

Além da expressão dos fenótipos de virulência, a alta patogenicidade do *Staphylococcus aureus* se deve à ampla resistência antimicrobiana entre os isolados, fator que tem dificultado consideravelmente o tratamento das infecções em âmbito mundial. ⁽²⁸⁾ De fato, desde o início da “era dos antibióticos”, essa espécie provou-se capaz de desenvolver resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos disponíveis na prática clínica. ⁽²⁹⁾ Em meados da década de 1940, logo após a introdução da penicilina, foram relatadas cepas de *S. aureus* resistentes, seguidas por uma pandemia de resistência à referida droga. Prevalente inicialmente apenas nos hospitais, hoje a resistência à penicilina está presente em mais de 90% dos isolados da comunidade. Essas estirpes interrompem a ação do anel β -lactâmico da penicilina por meio da produção de uma penicilinase mediada por plasmídeos. ⁽¹⁶⁾

No final da década de 1950, foi introduzida a meticilina como um protótipo de uma classe de penicilinas resistentes à inativação por penicilinases. A essa classe pertence também a oxacilina. ⁽³⁰⁾ Embora apresentem grande potência antiestafilocócica, seu uso clínico foi limitado pela emergência da resistência. Estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (conhecidos pela sigla MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*) surgiram inicialmente na Europa na década de 1960, após a introdução da meticilina na prática clínica e emergiram como uma séria ameaça à saúde pública mundial. ^(30,31) Ao longo do tempo, sofreram grande disseminação em hospitais e em outros serviços de saúde. Já na década de 1990, a maioria dos

isolados de origem hospitalar eram MRSA. ⁽³²⁾ Um fenômeno mais preocupante se observou na década seguinte: a identificação de MRSA em pessoas sem história de exposição a ambiente hospitalar. ⁽³³⁾ Nesse cenário, delinearam-se duas importantes classes de microrganismos problema, identificadas como HA-MRSA (*Hospital-acquired* [adquiridos no hospital]-MRSA) e CA-MRSA (*Community-acquired* [adquiridos na comunidade]-MRSA). ⁽³⁴⁾

A distinção entre cepas de HA-MRSA e CA-MRSA foi possível até o surgimento do primeiro relato de CA-MRSA. Consideravam-se infecções por CA-MRSA aquelas ocorridas em indivíduos oriundos da comunidade, que não apresentassem fatores de risco de exposição ao ambiente hospitalar, exibindo um perfil de sensibilidade distinto dos HA-MRSA. Porém, nos últimos anos, um fato interessante é a infiltração do CA-MRSA no ambiente hospitalar, ocupando lugar dos HA-MRSA, principalmente em países em que a prevalência do CA-MRSA é alta. ⁽²⁰⁾

Ainda que na atualidade seja difícil a distinção entre essas cepas em termos de apresentação clínica, sensibilidade antimicrobiana e caracterização molecular, é possível identificar características distintas (quadro 2) dos CA-MRSA, quando comparados aos HA-MRSA.

Quadro 2. Diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA

	HA-MRSA	CA-MRSA
Pacientes típicos	Pacientes idosos muitas vezes debilitados Pacientes com doenças crônicas (ex. diabéticos com úlceras de pele)	Pessoas saudáveis, frequentemente jovens. Indivíduos envolvidos em atividades de contato próximo (ex. equipes esportivas ou serviços militares, especialmente aquelas que resultam em abrasões de pele)
Infecções clínicas	Pacientes em Unidades de Terapia Intensiva. Pacientes com doenças renais associados a dispositivos de longa permanência. Infecções de ferida, doenças respiratórias e do trato urinário.	Tendem a ser mais agressivas na pele e tecidos moles. Pneumonias necrotizantes, choque séptico e bacteremia nos casos mais graves.
Fatores de risco	Dispositivos invasivos, hospitalização e uso de antibióticos prolongados.	Contato físico próximo, baixas condições de higiene, instalações sanitárias compartilhadas, indivíduos que vivem em

		locais superlotados, (ex. recrutas militares, prisioneiros).
Transmissão	Hospitalar, pouco difundida entre os contatos intradomiciliares.	Predominantemente adquirida na comunidade Dissemina-se no seio das famílias e equipes esportivas
Susceptibilidade antibiótica	Geralmente resistentes à eritromicina, ciprofloxacina, aminoglicosídeos, clindamicina, tetraciclina, rifampicina e ácido fusídico.	Geralmente mais susceptíveis aos agentes não-betalactâmicos, incluindo a ciprofloxacina.
Características moleculares	SCC <i>mec</i> tipos I, II ou III (exceto o EMRSA 15 da Inglaterra que tem o SCC <i>mec</i> tipo IV) PVL é menos comum	Principalmente o SCC <i>mec</i> tipo IV ou V. PVL é mais comum.

Fonte: Cooke et al.,⁽³⁴⁾

De acordo com estudos realizados nos EUA, um modelo matemático determinístico previu que o CA-MRSA se tornará a cepa dominante em instituições hospitalares e estabelecimentos de saúde, mediante à expansão dos reservatórios de CA-MRSA na comunidade e à crescente admissão de indivíduos portadores da cepa em hospitais. Além disso, pesquisadores têm sugerido que o CA-MRSA pode estar invadindo ambientes hospitalares, causando infecções com início até 72 horas de admissão no hospital.⁽³⁴⁾

A resistência à meticilina é mediada por uma alteração no receptor celular dos beta-lactâmicos, a proteína ligadora de penicilina (PBP2a), a qual tem baixa afinidade à penicilina e é codificada pelo gene *mecA*, conferindo resistência a maioria dos antibióticos pertencentes a classe dos β -lactâmicos.^(16,35)

O gene *mecA* está localizado em uma “ilha genômica” de resistência, conhecida como cassete cromossômico estafilocócito *mec* (SCC*mec*, *Staphylococcal chromosome cassette mec*).⁽³⁶⁾ Os elementos do SCC*mec* são divididos em diferentes tipos com base nas diferenças entre os nucleotídeos em dois componentes essenciais: complexo *ccr* (recombinase cassete cromossômico), representado pelos genes *ccr*, e complexo de genes *mec*.⁽²⁰⁾ Segundo o IWG-SCC (*International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements*), existem cerca de onze tipos de SCC*mec* em cepas de *S. aureus* descritos até o momento, que diferem em tamanho e composição dos elementos de resistência antimicrobiana.^(16,37)

Geralmente, cepas HA-MRSA albergam o SCC*mec* tipo I, II ou III, que são maiores e incluem diversos determinantes de resistência. Por essa razão, isolados hospitalares de MRSA

costumam apresentar resistência simultânea a várias classes de antimicrobianos. Por outro lado, as cepas de MRSA adquiridas na comunidade carregam um SCC mec menor tipo IV, V, VI, apresentando menos elementos de resistência, ou seja, frequentemente mais susceptíveis a macrolídeos, quinolonas, tetraciclinas, trimetoprim, sulfametoxazol, e lincosamidas. No entanto, podem estar associados à presença de genes codificadores da PVL e de outras exotoxinas que conferem aos CA-MRSA maior virulência.⁽³⁸⁾ Essas cepas estão associadas a infecções graves de pele e pneumonias necrotizantes.⁽³⁹⁾

As opções terapêuticas para MRSA (e em particular HA-MRSA) eram bastante restritas. No entanto, devido aos grandes investimentos de indústrias farmacêuticas, atualmente se dispõe de uma lista considerável de opções para tratamento de MRSA. Além da vancomicina, teicoplanina, linezolida, daptomicina, tigeciclina, oritavancina e dalbavancina, existem as cefalosporinas de quinta geração recentemente introduzidas no mercado, como a ceftarolina e ceftobiprole.⁽⁴⁰⁾

Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) ainda são as drogas comumente utilizadas contra essas cepas. No entanto, isolados com susceptibilidade intermediária a esse agentes foram descritos desde a década de 1990.^(40,41) Fato ainda mais preocupante é a emergência de *S. aureus* com resistência completa a vancomicina, que se deve à aquisição de genes *vanA* a partir de enterococos resistentes à vancomicina. Felizmente, esse fenótipo tem distribuição reservada, com 13 casos descritos nos Estados Unidos e 1 caso descrito no Brasil.^(42,43) Drogas como a linezolida e a daptomicina são comumente recomendadas para tratamento de *S. aureus* resistente a meticilina.⁽⁴⁴⁾ No entanto, resistência parcial ou completa a esses agentes já foi detectada. Lipoglicopeptídeos tais como a telavancina, oritavancina, dalbavancina e também as cefalosporinas de quinta geração tem se mostrado como uma boa opção para tratamento de *S. aureus* resistente.⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾

1.2 Estudos sobre colonização/infecção por *Staphylococcus aureus* em populações indígenas

CA-MRSA emergiu como uma das principais causas de infecções de pele e tecidos moles em diversas partes do mundo. Nos EUA, o clone USA300 tem sido responsável por aproximadamente 70% dessas infecções. Já na Austrália, onde foram realizados grandes estudos com *Staphylococcus aureus* em comunidades nativas, existe uma diversidade cada vez maior de estirpes reconhecidas em circulação. Grupos clonais previamente reconhecidos

foram descritos em regiões geograficamente distintas. Os dados levam a crer, hipoteticamente, que a ocorrência dessa transmissão é facilitada em populações socialmente desvantajadas, e presume-se até que essas cepas tenham surgido a partir dessas definições.⁽⁴⁹⁾

Há algum tempo, pesquisadores clínicos afirmam que as infecções por *Staphylococcus aureus* podem estar associadas a atributos raciais, sociais e físicos do hospedeiro humano. De acordo com uma análise secundária realizada pelo NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) 2001-2002, a origem racial é um dos principais determinantes dos riscos de colonização e infecção pela bactéria. Indivíduos brancos ou caucasianos apresentam risco estatisticamente maior de serem colonizados do que negros ou hispânicos. Populações indígenas também se mostram mais propensas em relação aos riscos para colonização e infecção por CA-MRSA, como se tem observado entre os nativos americanos, populações das ilhas do Pacífico e os aborígenes australianos.⁽¹⁶⁾

Dentre as populações de alto risco para ocorrência de surtos de CA-MRSA, além das comunidades indígenas, encontram-se as equipes de esportes coletivos, indivíduos encarcerados, militares, pessoas que frequentam locais aglomerados como crianças em creches e homens que praticam sexo com homens.⁽⁵⁰⁾

Comportamentos culturalmente típicos entre diferentes populações, tais como viver em condições de superlotação, assistência à saúde prejudicada e condições precárias de higiene podem ser mais relevantes na patogênese de algumas formas de infecções por *S. aureus*. Deste modo, os nativos inegavelmente se enquadram no grupo de risco para o carregamento de microrganismos resistentes, estando susceptíveis tanto à aquisição quanto à disseminação de infecções.^(49,51)

Sabe-se que as cepas de CA-MRSA não apresentam multirresistência; no entanto, albergam um elemento genético móvel *SCCmec* menor (normalmente tipo IV ou V) que lhes garantem maior mobilidade. Infecções ocasionadas por essa estirpe têm sido vistas tanto no ambiente comunitário quanto no hospitalar, com grandes surtos ocasionais, o quê também tem ocorrido com as cepas HA-MRSA. Acredita-se que linhagens de MSSA sejam susceptíveis de adquirir o gene de resistência (*mecA*) de outras fontes, tais como os *Staphylococcus coagulase-negativa*. Há evidências de que esse fato incida com mais frequência do que se pensava, sendo mais propenso em locais caracterizados por intensa carga de colonização e infecções de pele frequentes.^(52,53)

Em estudos retrospectivos realizados em comunidades indígenas americanas submetidas à assistência em saúde, a ocorrência de infecções por MRSA correlacionada aos fatores de risco foi de 74% sendo que, do total de isolados (112), 55% eram MRSA e 45%

MSSA.⁽⁵⁴⁾ Já um trabalho realizado com aborígenes australianos, a partir de amostras de lesões de pele e *swabs* de garganta, identificou durante o período de um ano uma taxa de 58% de *S. aureus* em que 23% destes eram resistentes. Os achados foram similares aos obtidos na comunidade, não havendo variação em nível de sazonalidade.⁽⁵²⁾ Outro estudo realizado com a população aborígene revelou presença de MRSA em 61% dos isolados, contra 33% na população não-nativa.⁽⁵⁵⁾

As populações indígenas apresentam altas taxas de doenças em virtude de uma profunda desigualdade de saúde em comparação as populações não-indígenas. Dessa forma, é notável que indivíduos nativos são altamente negligenciados no que se diz respeito aos serviços de atenção pública. Neste cenário, as principais características entre os padrões de morbidade e mortalidade incluem altas taxas de doenças infecciosas, altas taxas de mortalidade materna e infantil e baixa expectativa de vida ao nascer.⁽⁵¹⁾

Vale ressaltar que a ocorrência de infecções por CA-MRSA em populações nativas ou aborígenes tem sido crescente em todo mundo, sendo que os estudos realizados permitiram inferir que indivíduos aborígenes carreadores da cepa foram seis vezes mais propensos a desenvolverem infecção do que não-aborígenes.⁽⁵⁵⁾

Embora a epidemiologia e características clínicas do MRSA em comunidades nativas como os aborígenes sejam similares as de outros países, sabe-se que existe distinção entre essas infecções em grupos não-indígenas.⁽⁴⁹⁾

1.2.1 Cenário Nacional

No Brasil, residem aproximadamente 230 grupos étnicos indígenas. Desta forma, o país apresenta uma das mais amplas diversidades sociais do continente, ainda que a proporção total da população ainda seja uma das mais baixas.⁽⁵⁶⁾

Embora a população indígena do Brasil seja considerada pequena, mais da metade de todas as etnias da América Latina estão localizadas neste país. Existem cerca de 220 povos distintos, falando cerca de 180 línguas diferentes. Os estados de maior concentração indígena são o Amazonas, Acre, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Roraima, sendo que a maioria vive sob condições precárias de saúde.⁽⁵⁷⁾

Estudos demográficos realizados apontam que, nos últimos anos, houve um crescimento rápido da população em alguns grupos indígenas. Todavia, os indicadores dos povos indígenas tendem a ser piores do que para os não-indígenas, sendo necessário o

aumento da frequência de estudos a fim de compreender os complexos determinantes sócio-biológicos de saúde desses povos. O panorama mundial revela que tais grupos apresentam altas taxas de doenças, em virtude de uma profunda desigualdade de saúde em comparação com as populações não-indígenas, fato que não difere da situação brasileira atual. ⁽⁵¹⁾

Existem fortes evidências da ocorrência de infecções por CA-MRSA nas comunidades nativas em vários países ao redor do mundo, principalmente por se tratarem de indivíduos que vivem em condições propícias para aquisição e disseminação de microrganismos resistentes, o que se explica especialmente por conta de fatores demográficos e socioeconômicos. ⁽⁵⁵⁾ Porém, no Brasil ainda são escassos os relatos de CA-MRSA em populações específicas.

Embora não existam estimativas seguras, é razoável inferir que as infecções estafilocócicas sejam bastante incidentes na população brasileira como um todo. Em um relato do programa SENTRY, *S. aureus* foi o agente mais frequentemente isolado em espécimes clínicos de hospitais brasileiros. O microrganismo manteve a liderança entre os agentes de infecções de tegumento e corrente sanguínea, e ficou em segundo lugar entre os agentes de pneumonias. ⁽⁵⁸⁾ Dados mais recentes confirmaram esse padrão, e identificaram resistência à metilicina em 31,0% dos isolados. ⁽⁵⁹⁾ Por outro lado, o sistema de vigilância de infecções hospitalares do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo reportou o isolamento de *S. aureus* em 14% das hemoculturas colhidas em Unidades de Terapia Intensiva (2015), sendo que, ao todo, 67% dos isolados eram de MRSA. ^(60,61)

A ampla disseminação de MRSA em hospitais do Brasil é bem documentada. Por outro lado, embora o MRSA seja endêmico nos hospitais, ainda são poucos os relatos sobre colonização por CA-MRSA no país.

Nascimento-Carvalho et al., relatam a identificação de 125 infecções de pele por MRSA adquiridas na comunidade, mas não realizaram caracterização molecular desses isolados. ⁽⁶²⁾ Por outro lado, relatos de casos isolados ⁽⁶³⁾ e estudos em bancos de cepas documentaram a disseminação de isolados de MRSA carreando SCC*mec* IV em centros urbanos do país. Estudo recente, realizado com indivíduos hígidos de uma população do interior do estado de São Paulo, evidenciou taxa de 0,9% de MRSA. ^(64,65)

O combate ao surgimento, bem como a contenção da disseminação do CA-MRSA podem exigir o redirecionamento e criação de novas estratégias para o controle de infecções dirigidas a grupos específicos da comunidade. Assim, se faz necessária também uma melhor compreensão da epidemiologia das infecções estafilocócicas nessas populações ⁴⁶, visando não somente uma assistência qualitativa, como também a equidade no cuidado à saúde indígena.

2 JUSTIFICATIVA

Os povos indígenas se destacam por terem preservado suas origens com o passar dos anos, além de ganharem protagonismo pela prática de hábitos e costumes exóticos. No entanto, essas peculiaridades acabam tornando o grupo suscetível em relação ao surgimento e disseminação de diversos tipos de doenças, incluindo as infecções relacionadas a linhagens de *Staphylococcus spp.* O fato de serem grupos negligenciados no que se diz respeito à assistência em saúde somado à ampla capacidade desse microrganismo enquanto agente causador de infecção impulsionou a realização desse estudo. Considerando ainda a escassez de pesquisas nessa temática, a proposta desse trabalho foi trazer luz a questões relacionadas à epidemiologia molecular de *S. aureus* entre populações indígenas de regiões distintas do país.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Identificar a prevalência e fatores de risco para carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (MSSA e MRSA) em indígenas de comunidades do Norte e Sudeste do Brasil, avaliando a diversidade genética, a disseminação, fatores de virulência e a resistência antimicrobiana, associados às questões étnicas, demográficas, ambientais e comportamentais.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar *Staphylococcus aureus* provenientes de mucosa nasal e oral de indígenas, identificando a susceptibilidade *in vitro* à meticilina (oxacilina) e à vancomicina por métodos fenotípicos e moleculares.
- Identificar fatores demográficos, comportamentais, ambientais e étnicos associados ao carreamento nasal de MRSA e MSSA.
- Aplicar um protocolo rápido para detecção de MRSA e produção de Leucocidina Panton-Valentine.
- Caracterizar o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) dos isolados colonizantes de MRSA.
- Identificar a presença de genes de virulência em isolados de *S. aureus* colonizantes nasais/orais da população estudada.
- Identificação do perfil clonal das linhagens de *S.aureus* identificadas no estudo

4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, de base populacional.

4.1 Local do Estudo

- Aldeias indígenas Kopenoti e Tereguá situadas no município de Avaí – São Paulo.

O município de Avaí localiza-se a 22°08'48" de latitude sul e a 49°19'59" de longitude oeste, estando a uma altitude de 481 metros. Sua população é totalizada em 4.615 habitantes, sendo 2.425 homens e 2.190 mulheres, de modo que 1.400 pessoas residem na zona rural enquanto 3.196 vivem na zona urbana. A cidade possui um distrito (Nogueira) e a Reserva Indígena Araribá, com dois postos (Posto Indígena Kopenoti, e o Posto Nimuendaju).

As aldeias incluídas no estudo são Kopenoti e Tereguá, alocadas na reserva indígena de Araribá (a 39 quilômetros da cidade de Bauru). A Aldeia Kopenoti apresenta a etnia predominante Terena, e uma população de 195 indivíduos. Já a Aldeia Tereguá possui como etnias predominantes a Terena e a Guarani, somando uma população de 111 nativos. Fonte: Funasa, Polo de Bauru – SP. ⁽⁶⁶⁾ Aldeias indígenas Kaxinawá, Ashaninka, Shanenawa e Poyanawas, localizadas no Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) do Alto do Rio Juruá, município de Cruzeiro do Sul – Acre.

Cruzeiro de Sul localiza-se a 7° 39' 54" sul, 72° 39' 1" oeste. Definido como o segundo maior município do estado do Acre, dista aproximadamente 648 km da capital do estado Rio Branco pela rodovia BR-364, apresentando uma área de 7.781,5 Km², o que equivale a 26,30% da região do Vale do Juruá e a 5,08% da área total do Estado. Limita-se ao norte com o estado do Amazonas, ao sul com o município acreano de Porto Valter, ao leste com o município de Tarauacá e a oeste com os municípios acreanos: Mâncio Lima, Rodrigues Alves e também o com o Peru. Segundo dados do IBGE – (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a população do município é totalizada em 78.444 habitantes (Censo IBGE/2010), composta principalmente pelo elemento indígena e pelos nordestinos que vieram à região em grande número no início do século XX para a extração da borracha. Estima-se que no DSEI do Alto do Rio Juruá existam mais de 1500 nativos distribuídos por várias terras indígenas (Quadro 3). ⁽⁶⁷⁾

Entre as comunidades indígenas situadas na região, as aldeias Kaxinawá, Ashaninka, Shanenawa e Poyanawas fizeram parte do estudo em questão. A aldeia Kaxinawá pertence ao

tronco linguístico Pano, representando o povo de maior população no Acre. Os Ashaninka são da língua Aruak e habitam a região do Juruá desde o fim do século XIX nas regiões dos rios Amônia, Envira e Breu, um território onde predominam outros povos falantes da língua Pano. Ambas as aldeias supracitadas pertencem a comunidades nativas mais afastadas do Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) do Alto do Rio Juruá. ⁽⁶⁷⁾ Dentre as demais populações, a aldeia Shanenawa está situada no município de Feijó, numa comunidade conhecida como Morada Nova. Por fim, o povoado Poyanawas vive no Município de Mâncio Lima, localizado às margens direitas do Paraná Japiim, área a 550.223,0445, perfazendo um campo de 5.451,1 Km² que se estende a 30 Km da foz do Rio Môa na região Norte do Brasil, extremo oeste da Amazônia, e no ponto mais ocidental do País. Os Poyanawas compõem uma população de 403 indivíduos cuja língua falada é o Pano. ⁽⁶⁷⁾

4.2 População do Estudo

O tamanho amostral foi estabelecido utilizando-se o cálculo para proporções, nível de 5% de significância e 5% de precisão, proporcionalmente ao número de indivíduos de cada aldeia, ficando então determinado um total de 108 indígenas na população maior de Bauru e 62 na sua população menor. No Acre foram 297 indivíduos tomados proporcionalmente ao número de indivíduos de cada aldeia (quadro 3). Foram incluídos no estudo indígenas que tenham mais de um ano de idade, sejam residentes nas aldeias referidas e que consentirem em participar voluntariamente da pesquisa. De acordo com esses parâmetros, estimaram-se para o estudo 467 indivíduos.

Quadro 3. Distribuição da população indígena estimada para o estudo

Povo	Terra indígena	Município	População	Amostra
Kopenoti	Reserva Indígena Araribá	Avaí	195	108
Tereguá	Reserva Indígena Araribá	Avaí	111	62
Poyanawa	Jaminawá/Envira	Mâncio Lima	-	93
Kaxinawá	Kaxinawá da Colônia Vinte e Sete	Tarauacá	114	26

Ashaninka	Kampa do Igarapé Primavera	Tarauacá	25	6
Shanenawa	Katukina/Kaxinawá	Feijó	1.083	247

4.3 Coleta de dados demográficos e clínicos

Precedendo a realização da coleta dos espécimes microbiológicos, foi realizada uma avaliação antropométrica incluindo dados de peso e altura dos sujeitos avaliados segundo critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e houve a aplicação de um questionário, com duração de em torno de 10 minutos, o qual (anexo 2) incluiu as seguintes informações:

- Dados demográficos (gênero, idade, etnia, religião);
- Escolaridade;
- Renda familiar;
- Tipo de habitação;
- Prática de poligamia;
- Material das paredes e piso do domicílio;
- Condições de saneamento;
- Fonte de abastecimento de água;
- Destino do lixo;
- Número de indivíduos que compartilham o mesmo domicílio;
- Frequência e local dos banhos;
- Prática de esportes (individuais ou coletivos);
- Morbidade referida (incluindo doenças crônicas);
- Acesso/utilização de serviços de saúde (incluindo internações nos últimos 12 meses) e práticas adicionais de cura;
- Ocorrência de infecções nos últimos 12 meses;
- Utilização de antimicrobianos nos últimos 12 meses;
- Frequência em instituições fechadas (creche, casa de repouso, presídio);
- Uso de álcool e drogas ilícitas (especialmente endovenosas);
- Tipo de substância utilizada para pigmentação da pele;
- Presença de lesões de pele.

4.4 Coleta dos espécimes microbiológicos

Amostras das mucosas nasal e oral foram coletadas simultaneamente através de *swabs* estéreis com meio de transporte. Os espécimes foram obtidos das narinas anteriores e orofaringe, utilizando um *swab* para cada sítio. A técnica de coleta nasal consistiu na umidificação do *swab* com SF 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas as narinas até a maior profundidade tolerável pelo sujeito da pesquisa e rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. O procedimento para coleta de orofaringe partiu da umidificação do *swab*, comprimindo o mesmo de forma suave sobre toda superfície da garganta, evitando o contato do coletor com a língua. Os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp para realização de semeadura em placas contendo Agar Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 48 horas, as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos microrganismos isolados.

4.5 Identificação da espécie

Os microrganismos que se desenvolveram a partir das culturas foram submetidos à coloração de Gram objetivando a pureza, observação da morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram feitas provas de catalase e coagulase em tubo conforme preconizado por Koneman et al. ⁽⁶⁸⁾

Para a confirmação genotípica dos isolados de *S. aureus*, realizou-se a pesquisa do gene *sau* após a extração no DNA bacteriano (item 3.8). ⁽⁶⁹⁾ Os oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene estão descritos no quadro 4.

Quadro 4. Oligonucleotídeos para a detecção do gene *sau*

Genes	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (pb)*
<i>SAU327</i>	1 GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA	241
<i>SAU1645</i>	2 CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT	241

*Tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb)

Fonte: Riffon., et al ⁽⁶⁹⁾

4.6 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados obtidos por meio da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).⁽⁷⁰⁾ Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de *Macfarland*. As drogas de escolha foram oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg). Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a sementeira foi feita através de *swab* estéril na superfície do *Ágar Mueller Hinton*, e a seguir, foram aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C por 16-18 horas, sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo (CLSI, 2016). A linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle para os experimentos. Amostras que apresentaram resistência à cefoxitina, foram adicionalmente testadas para as seguintes drogas penicilina (10U), ceftarolina (30 µg), quinupristina (15 µg), sulfametoxazol (23.7µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), e levofloxacina (5 µg).

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima das drogas oxacilina e vancomicina foi determinada pelo método de *E-test*. Este procedimento é um método quantitativo em que se faz o uso de tiras de plástico inertes e transparentes que medem 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura nas quais é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado. A concentração das diversas drogas no *E-test* varia de 0,002 a 256 µg/ml. Os parâmetros técnicos envolvidos na realização do *E-test* são: meio de cultura de *Mueller-Hinton Agar* com inóculo apresentando concentração final semelhante à turvação correspondente à escala 0,5 de *McFarland*, incubação das placas em aerobiose a 35-37° C. A leitura é realizada pela verificação na escala da parte anterior da fita, do valor correspondente à intersecção da zona de elipse de inibição do crescimento bacteriano. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo (CLSI, 2016), quadro 5.⁽⁷⁰⁾

Quadro 5. Limites da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) para categorização de *Staphylococcus aureus*.

Interpretação CIM ($\mu\text{g/mL}$) – <i>Staphylococcus aureus</i>			
Agente antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4
Vancomicina	≤ 2	4-8	≥ 16

Fonte: CLSI, 2016. ⁽⁷⁰⁾

4.8 Extração do DNA bacteriano

Para a extração, foi utilizado o Kit *Illustra (GE Healthcare)* que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 μl da solução de extração foram adicionados à mistura e a mesma foi centrifugada a 10.000 x g por 4 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi então descartado e 500 μl de solução de extração foram adicionados novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 μl da solução de lavagem foram adicionados à coluna e esta submetida à centrifugação a 20.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 μl de água Milli Q ou solução *Elution Buffer* aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição.

4.9 PCR real time

A técnica de PCR em tempo real procedeu-se utilizando um protocolo rápido para identificação de MRSA e amostras PVL-positivas.

4.9.1 Detecção do gene *mecA* de resistência à oxacilina.

O PCR em tempo real foi executado através do Sistema *LightCycler* (Roche). As reações de PCR foram realizadas em volumes totais de 20 μl contendo 2 μl de ácido nucleico, 3 mM MgCl_2 , 1 μM de cada iniciador (Quadro 6), 2 μl do mix 10x *Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green* (Roche). A incubação foi realizada em termociclador apropriado,

empregando os parâmetros descritos por Fang et al. ⁽⁷¹⁾ que consistem em: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos para ativar o *FastStart Taq* DNA polimerase, 35 ciclos com aquecimento a 20°C/s para 95°C, refrigeração a 20°C/s para 55°C com um intervalo de 5 segundos, e aquecimento a 20°C/s para 72°C com intervalo de 8 segundos. O ciclo um consiste no aquecimento a 20°C/s para 95°C, refrigeração a 20°C/s para 58°C com uma espera de 60 segundos, e de aquecimento em 0,1°C/s para 95°C. O protocolo termina com um ciclo de resfriamento a 20°C/s para 35°C, com uma espera de 30 segundos. O canal de fluorescência foi fixado em F1 (530 nm). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com o controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Quadro 6: Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

Iniciador	Sequência (5'-3')
<i>mecA1</i>	GCA ATC GCT AAA GAA CTA AG
<i>mecA2</i>	GGG ACC AAC ATA ACC TAA TA

Fonte: Fang et al., 2003 ⁽⁷¹⁾

4.9.2 Detecção dos genes da Leucocidina Panton-Valentine

Utilizou-se o protocolo descrito por Johnsson et al., ⁽⁷²⁾ em que as reações de PCR em tempo real apresentavam volume total de 20µl, contendo 2 µL do mix 10x *LightCycler FastStart* DNA Master SYBR Green I (Roche), 4 mM MgCl₂, 0,7 µM do iniciador "forward" e 0,5µM do iniciador reverso (quadro 7). A ciclagem térmica iniciou por 95°C por 10 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 52°C por 5 segundos e 72°C por 18 segundos. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional como o controle positivo (*S. aureus* USA300) e negativo (*S. aureus* ATCC 29213).

Quadro 7. Oligonucleotídeos para a detecção dos genes da Leucocidina Panton-Valentine.

Iniciador	Sequência (5'-3')
<i>Luk-PV-1</i>	GTA AAA TGT CTG GAC ATG ATC CA
<i>Luk-PV-2</i>	CAA (C/G)TG TAT TGG ATA GCA AAA GC

Fonte: Johnsson et al., 2004 ⁽⁷²⁾

4.10 Caracterização do SCC*mec*

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se um método de reação PCR-Multiplex conforme descrito por Milheiriço et al. ⁽⁷³⁾. Foram utilizados 8 loci (A-H) selecionados com base nas sequências do elemento *mec* descritas previamente. O locus A está localizado *downstream* ao gene *pls* e é específico para o SCC*mec* tipo I; o locus B é um fragmento interno do operon *kdp* que é específico para o SCC*mec* tipo II; o locus C é um fragmento interno do gene *mecl* presente nos SCC*mec* tipos II e III; o locus D é um fragmento interno da região *dcs* presente nos SCC*mec* tipos I, II e IV; o locus E está localizado na região entre o plasmídeo *pl258* e o transposon *Tn554*, sendo específico para SCC*mec* tipo III; o locus F, também específico para o SCC*mec* tipo III, está localizado entre o *Tn554* e a junção cromossômica direita (*orfX*). Os loci G e H foram incluídos para distinguir as variantes estruturais IA e IIIA, respectivamente. O locus G corresponde à junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110; o locus H corresponde à junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181.

4.11 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Tipagem por PFGE foi realizada segundo o protocolo modificado de McDougal et al., ⁽⁷⁴⁾. As amostras foram semeadas em caldo BHI, no qual obtiveram crescimento por 24 horas. Em um microtubo previamente pesado, 0,5ml da amostra crescida foi centrifugada a 12.000rpm por 50s. Depois de desprezado o sobrenadante, o microtubo foi novamente pesado e foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) mais a diferença entre o peso final e inicial em ml. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Após vortexar, foram adicionados 5µl de Lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose *low melt*.

As amostras foram depositadas nos moldes para plugues a fim de solidificarem, e posteriormente foram colocadas em 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas a 37°C por pelo menos 4h. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora. Cada restrição do DNA genômico foi feita em meio plugue com a enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) em 50µl de tampão de restrição.

A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) preparado com TBE 0,5X sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5X TBE como tampão de corrida. Como marcador molecular, foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs). Os géis foram corados com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 45min., e fotografados sob transiluminação UV. Para a análise de similaridade, o cálculo dos coeficientes de correlação Dice e a criação do dendograma pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages), foi utilizado o software *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

A cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325 foi utilizada para normatização dos géis (número de acesso GenBank CP000253). Para comparação das amostras do estudo, procedeu-se a análise das cepas de MRSA representantes de clones mundiais ou locais cedidas pelo Prof. Antônio Carlos Campos Pignatari (UNIFESP), obtidas da Universidade de Juntendo, Tóquio, cedidas pelo Prof. Keiichi Hiramatsu: NCTC 10422 (*SCCmec* tipo I), N315 (*SCCmec* tipo II), 85/2082 (*SCCmec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (*SCCmec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (*SCCmec* tipo IVb), MR 108 (*SCCmec* tipo IVc), JCSC 4469 (*SCCmec* tipo IVd), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (*SCCmec* tipo V), A1721/HU25 (Clone Brasileiro Epidêmico, *SCCmec* tipo III), WB72 (USA 300, *SCCmec* tipo IV), MW2 (USA 400, *SCCmec* tipo IV), WB49 (Oceania South Pacific Clone, *SCCmec* IV), HAR24 (EMRSA - 15, *SCCmec* tipo IV), HAR24 (EMRSA - 16, *SCCmec* tipo II), BK2464 (New York - Japan, *SCCmec* II), HDE288 (Clone Pediátrico / USA800, *SCCmec* IVa).

4.12 Pesquisa de genes de virulência (toxinas estafilocócicas)

Enterotoxinas e TSST-1: As reações de PCR para a detecção dos genes das enterotoxinas A, B, C, D, E e da TSST-1 foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al. ⁽⁷⁵⁾ e Cunha et al. ⁽⁷⁶⁾. Os primers utilizados estão descritos no quadro 8. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com SYBR Safe.

Hemolisinas alfa, beta e delta: As reações de PCR para os genes das hemolisinas alfa, beta e delta (*hla*, *hlb*, *hld*), assim como os primers utilizados, foram baseados segundo descrito por Marconi et al. ⁽⁷⁷⁾

Toxinas Esfoliativas: As reações para os genes das toxinas esfoliativas (*eta*, *etb* e *etd*) foram realizadas segundo descrito por Koning et al. ⁽⁷⁸⁾

Quadro 8. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de virulência.

Fator de virulência	Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Produto	Controle	Referência
Enterotoxina A	<i>Sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120pb	ATCC 13565	Johnson et al. ⁽⁷⁵⁾
		SEA-2	GAACCTTCCATCAAAAACA			
Enterotoxina B	<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACGACAAACG	478pb	ATCC 14458	Johnson et al. ⁽⁷⁵⁾
		SEB-2	GACGGTACTCTATAAGTGCC			
Enterotoxina C	<i>Sec</i>	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257pb	ATCC 19095	Johnson et al. ⁽⁷⁵⁾
		SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC			
		SEE-2	TAACTTACCGTGGACCCTTC			
Tox. 1 da Sind. Tóxico	<i>Tst</i>	TSST-1	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350pb	N315*	Johnson et al. ⁽⁷⁵⁾
		TSST-2	TTCCAATAACCACCCGTTT			
Toxina Esfoliativa A	<i>Eta</i>	ETA-1	CTAGTGCATTTGTTATTCAA	119pb	N5*	Koning et al. ⁽⁷⁵⁾
		ETA-2	TGCATTGACACCATAGTACT			
Toxina Esfoliativa B	<i>Etb</i>	ETB-1	ACGGCTATATACATTCAATT	200pb	ZM*	Koning et al. ⁽⁷⁵⁾
		ETB-2	TCCATCGATAATATACCTAA			
Toxina Esfoliativa D	<i>Etd</i>	ETD-1	AACTATCATGTATCAAGG	376pb		Koning et al. ⁽⁷⁵⁾
		ETD-2	CAGAATTTCCCGACTCAG			
Hemolisina α	<i>hla</i>	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAAT TCGATTG	209pb	N315	Marconi et al. ⁽⁷⁷⁾
		HLA-2	CTTTCAGCCTACTTTTTTAT CAGT			
Hemolisina β	<i>hlb</i>	HLB-1	GTGCACTTACTGACAATAGT GC	309pb	RN4420*	Marconi et al. ⁽⁷⁷⁾
		HLB-2	GTTGATGAGTAGCTACCTTC AGT			
Hemolisina δ	<i>hld</i>	HLD-1	ATGGCAGCAGATATCATTTTC	357pb	N315	Marconi et al. ⁽⁷⁷⁾
		HLD-2	CGTGAGCTGGGAGAGAC			

*Tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb); **Cepas gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elza Mamizuka (USP).

4.13 Detecção dos genes envolvidos na formação e adesão do biofilme

As reações de PCR para a detecção dos genes codificadores do biofilme foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Arciola et al. ⁽⁷⁹⁾ Os primers utilizados estão descritos no quadro 9. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com SYBR Safe. Em todas as reações realizadas foram

utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228.

Quadro 9. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção do operon *ica*

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>icaA1</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103 bp*
Primer	<i>icaA2</i>	GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC	103 bp*
Primer	<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198 bp*
Primer	<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198bp*
Primer	<i>icaB1</i>	CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA	302bp*
Primer	<i>icaB2</i>	AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT	302bp*
Primer	<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400bp*
Primer	<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	400bp*

Fonte: * Arciola et al, 2005⁽⁷⁹⁾

4.14 Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* por MLST

4.14.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído com a utilização do kit comercial (*HiYield Gel/PCR DNA Extraction Kit Real – Biotech - RBC*) para sangue e baseado em coluna de sílica, conforme as instruções do fabricante.

4.14.2 Amplificação dos genes conservados para o MLST

Os genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL* foram amplificados separadamente com os *primers* abaixo (quadro 10), conforme descrito por Enright et al.⁽⁸⁰⁾. Os parâmetros da PCR foram desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. O ciclo foi repetido 35 vezes e uma extensão final de 5 minutos a 72°C foi realizada.

4.14.3 Sequenciamento e análise do MLST

O amplificado de cada gene foi purificado com kit específico e preparado para a realização de sequenciamento das duas fitas (senso e antisenso). A análise foi realizada a partir da fita consenso através do software *BioNumerics* (versão 7.6; *Applied Maths*, Bélgica).

Quadro 10. Primers utilizados na amplificação dos 7 genes conservados

Genes	Primers	Sequências	Fragmentos
<i>Arc</i>	arc up	5'- TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3'	456 pb
	arc dn	5'- AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'	
<i>aroE</i>	aro up	5'- ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3'	456 pb
	aro dn	5'- GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'	
<i>glpF</i>	glp up	5'- CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3'	465 pb
	glp dn	5'- TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'	
<i>gmk</i>	gmk up	5'- ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3'	429 pb
	gmk dn	5'- TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'	
<i>Pta</i>	pta up	5'- GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3'	474 pb
	pta dn	5'- GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'	
<i>Tpi</i>	tpi up	5'- TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3'	402 pb
	tpi dn	5'- TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'	
<i>yqiL</i>	yqi up	5'- CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3'	516 pb
	yqi dn	5'- CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'	

5 Análise e-BURST

Com o intuito de se identificar grupos de genótipos relacionados, ou seja, Complexos Clonais - CCs, prevendo o ancestral dos mesmos, foi realizada adicionalmente uma análise pelo algoritmo *eBURST*. O programa compara os alelos de cada *Sequence typing* - ST independente das linhagens. Quanto maior o número de alelos iguais, maiores as chances dos STs agruparem-se. O resultado é observado através de um diagrama radial, onde o genótipo fundador fica localizado no centro do diagrama. Os critérios utilizados pelo *eBURST* são: sete

loci por isolado, sendo pelo menos seis loci idênticos para definição do grupo e pelo menos três variações de loci para definição de subgrupo. Para verificar a relação dos STs encontrados neste estudo, foi utilizado o programa *eBURST* v.3 *S. aureus* Database, disponível em: <http://eburst.mlst.net>.⁽⁸¹⁾

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a coleta e análise dos dados foram utilizados os *softwares* EPI-INFO for Windows, versão 3.5.1 (© *Centers for Disease Control and Prevention*, USA) e SPSS versão 19.0 (© SPSS, inc.). Foram aplicados os procedimentos rotineiros para análise de estudos de delineamento transversal. A base do estudo foi formada pelos sujeitos (indígenas) que apresentaram cultura positiva para *S. aureus*. Empregou-se uma análise uni e multivariada de regressão Poisson^(82,83) para fatores de risco associados ao carregamento por *Staphylococcus aureus*.

7 ANÁLISE QUESTÕES ÉTICAS

O estudo proposto submetido à avaliação dos seguintes órgãos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Fundação Nacional do índio - FUNAI, e Comitê de Ética Nacional – CONEP. CAAE: 08428912.3.0000.5411, parecer 674.368.

8 RESULTADOS

8.1 Amostragem

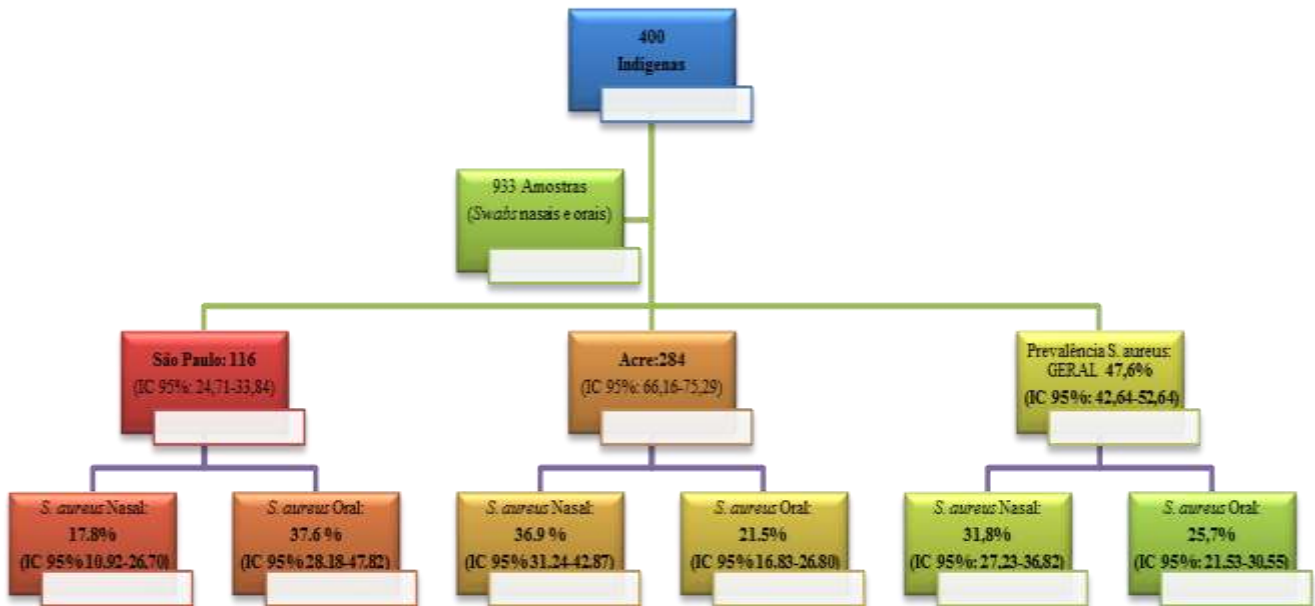
Foram coletadas amostras de 443 indivíduos, porém, pela incongruência no preenchimento de alguns questionários, foram incluídos no estudo 400 dos indivíduos. A partir das amostras coletadas por meio de *swabs* de origem nasal e oral, obteve-se um total de 931 espécimes, advindos de sujeitos hígidos pertencentes às populações indígenas do sudeste e norte do Brasil. Em diversas situações houve crescimento de mais um tipo de espécime na amostra coletada, o que justifica o número de espécimes superior ao dobro de indivíduos nos quais se procederam as coletas.

Do total de indígenas analisados, 116 (IC 95%: 24,71-33,84) estavam lotados nas aldeias Kopenoti e Tereguá, no município de Avaí-SP, região sudeste, e 284 (IC 95%: 66,16-75,29) eram vinculados às comunidades indígenas Shanenawá, Kaxinawá, Ashaninka e Poyanawas localizadas no estado do Acre, região norte do país.

8.2 Prevalência de carreamento de *Staphylococcus aureus*

A identificação dos espécimes microbiológicos evidenciou uma prevalência de colonização por *S. aureus* entre as populações indígenas de 47,6% (IC 95%: 42,64-52,64), totalizando 190 isolados. Quando realizada a distribuição entre os sítios, obteve-se uma prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* de 31,8% (IC 95%: 27,23 -36,82), enquanto na mucosa oral constatou-se uma prevalência de 25,7 % (IC 95%: 21,53-30,55). Já na análise por região, identificou-se prevalência de 43,1 % (IC 95% 33.94-52.62) no estado de São Paulo, e 49,4 % (IC 95% 43.50-55-45) no estado do Acre. (figura 1)

Figura 1. Distribuição das amostras por região e prevalência de carreamento por *S. aureus* entre sítios de colonização.



8.3 Determinação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

Todas as 190 amostras identificadas como *S. aureus* tanto pelos métodos fenotípicos quanto moleculares foram submetidas aos testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* utilizando as drogas oxacilina e cefoxitina. O método de disco-difusão evidenciou 4 amostras resistentes à oxacilina (halo ≤ 10) e/ou cefoxitina (halo ≤ 21), dentre as quais 1 pertenceu aos isolados de origem nasal enquanto as outras 3 foram advindas da mucosa oral. Além disso, os isolados foram testados para as seguintes drogas: penicilina, ceftarolina, quinupristina, sulfametoxazol, clindamicina, eritromicina e levofloxacina.

Os espécimes nos quais se pôde constatar resistência à meticilina foram submetidos à análise pelo método *E-test* utilizando fitas impregnadas com oxacilina e vancomicina para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos através dos testes para determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação da susceptibilidade antimicrobiana pelos métodos de disco-difusão e *E-test* (Oxacilina e Vancomicina).

Antibióticos testados	165-O	286-O	301-O	301-N
Penicilina	09 mm-R	23 mm-R	09 mm-R	09 mm-R
Oxacilina	09 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Oxacilina - CIM	1,5 µg/ml-S	6 µg/ml-R	1,0 µg/ml-S	1,0 µg/ml-S
Cefoxitina	16 mm-R	13mm-R	14 mm-R	15 mm-R
Ceftarolina	25 mm-S	27 mm-S	25 mm-S	24 mm-S
Vancomicina	17 mm –	20 mm –	12 mm –	23 mm –
Vancomicina - CIM	1,0 µg/ml-S	0,5 µg/ml-S	1,5 µg/ml-S	1,5 µg/ml-S
Quinupristina	23 mm-S	25 mm-S	24 mm-S	24 mm-S
Sulfa	27 mm-S	18 mm-S	31 mm-S	29 mm-S
Clindamicina	29 mm-S	30 mm-S	27 mm-S	27 mm-S
Eritromicina	24 mm-S	14 mm-I	26 mm-S	26 mm-S
Levofloxacina	27 mm-S	25 mm-S	24 mm-S	23 mm-S

CIM – Concentração Inibitória Mínima. S – Sensível; R – Resistente; I – Intermediário. *Breakpoints*: CLSI, 2016.

8.4 Detecção do gene *mecA* (de resistência à meticilina) e caracterização do SCC*mec*

Das 190 amostras de *S. aureus* estudadas, 3 (orais) foram positivas para o gene *mecA*, as quais foram detectadas utilizando o protocolo rápido de identificação por meio da técnica de PCR em Tempo Real (figura 2). Dessa forma, há prevalência de MRSA entre os isolados de 0,7% (IC 95%: 0,19-2,37) tanto pelos métodos fenotípicos quanto genotípicos.

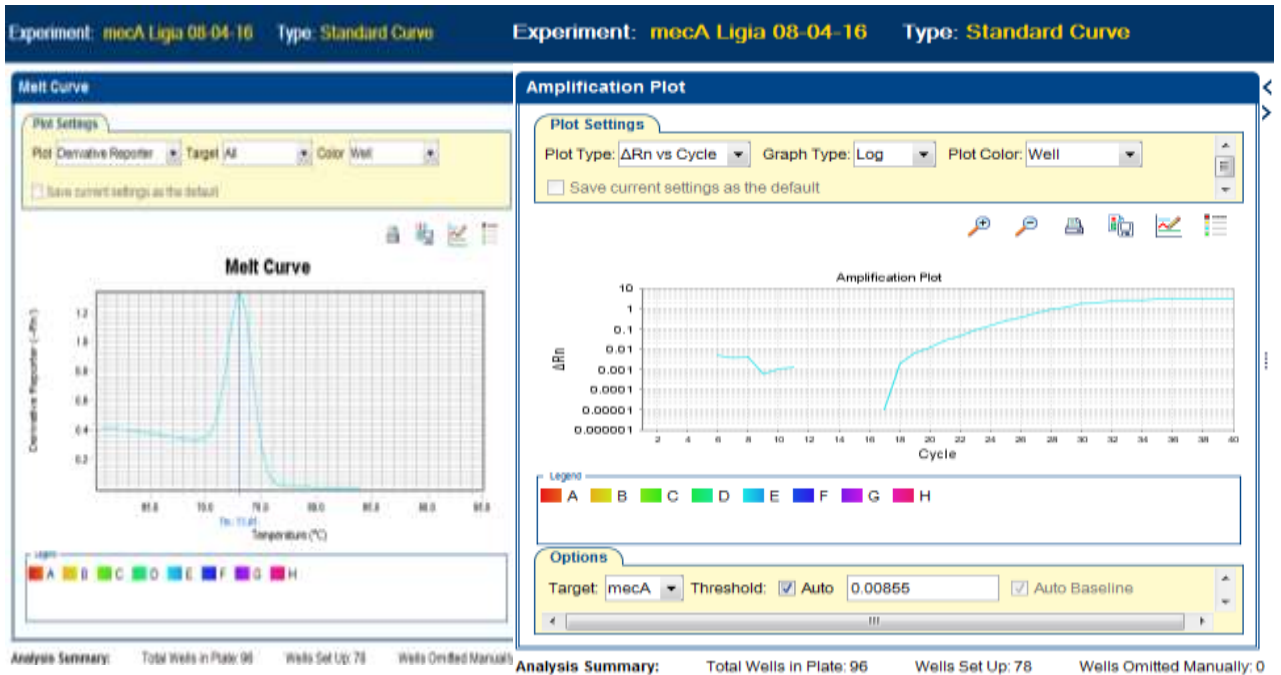


Figura 2. Curva de *Melting* (Padrão) e corrida da reação do gene *mecA* no *Real Time PCR – Step One Plus (Applied Maths)*.

8.5 Detecção dos genes da Leucocidina Panton-Valentine

Em relação à detecção do gene codificador da Leucocidina de Panton-Valentine, pode-se evidenciar através da técnica da PCR em tempo real, um total de 24 (9%) amostras de *S. aureus* de origem nasal carreando o gene, enquanto as amostras orais continham a metade 12 (4,5%) desses.

8.6 Pesquisa dos genes de virulência (toxinas estafilocócicas)

A pesquisa dos genes relacionados às toxinas estafilocócicas revelou uma distribuição bastante diversificada entre os isolados. A tabela 2 mostra as taxas de prevalência dos genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec*), esfoliatinas (*eta*, *etb*, *etd*), gene associado a toxina 1 da síndrome do choque tóxico TSST-1 (*tst*) e hemolisinas (*hla*, *hly*, *hld*).

Tabela 2. Distribuição dos genes de virulência entre os isolados de *S. aureus*

Genes de Virulência	Prevalência (%)	IC 95%
Enterotoxina A – gene <i>sea</i>	18 (9,4)	5,68-14,48
Enterotoxina B – gene <i>seb</i>	27 (14,1)	9,53-19,90
Enterotoxina C – gene <i>sec</i>	38 (19,9)	14,48-26,27
Toxina 1 da S. Choque Tóxico – gene <i>tsst-1</i>	12 (6,5)	3,41-11,11
Hemolisina α – gene <i>hla</i>	184 (96,3)	1,49-7,41
Hemolisina β – gene <i>hlb</i>	39 (20,4)	14,94-26,84
Hemolisina δ – gene <i>hld</i>	154 (80,6)	14,02-25,70
Esfoliatina A – gene <i>eta</i>	7 (3,6)	1,49-7,41
Esfoliatina B – gene <i>etb</i>	13 (6,8)	3,67-11,36

8.7 Detecção dos genes envolvidos na formação do biofilme (*operon icaABCD*)

A análise dos genes envolvidos na produção do biofilme revelou uma prevalência dos genes *icaA* e *icaD* entre os isolados de *S. aureus* (tabela 3). Apenas 2 amostras albergaram o operon completo *icaABCD*, sendo uma proveniente dos indígenas do estado de São Paulo e outra do Acre.

Tabela 3. Distribuição dos genes relacionados à produção de biofilme entre os isolados *S. aureus*

Genes relacionados à formação do Biofilme	Prevalência	IC 95%
Gene <i>icaA</i>	157 (82,2)	12,65-23,98
Gene <i>icaB</i>	2 (1,0)	0,13-3,73
Gene <i>icaC</i>	15 (7,8)	4,46-12,62
Gene <i>icaD</i>	139 (72,7)	21,05-34,12

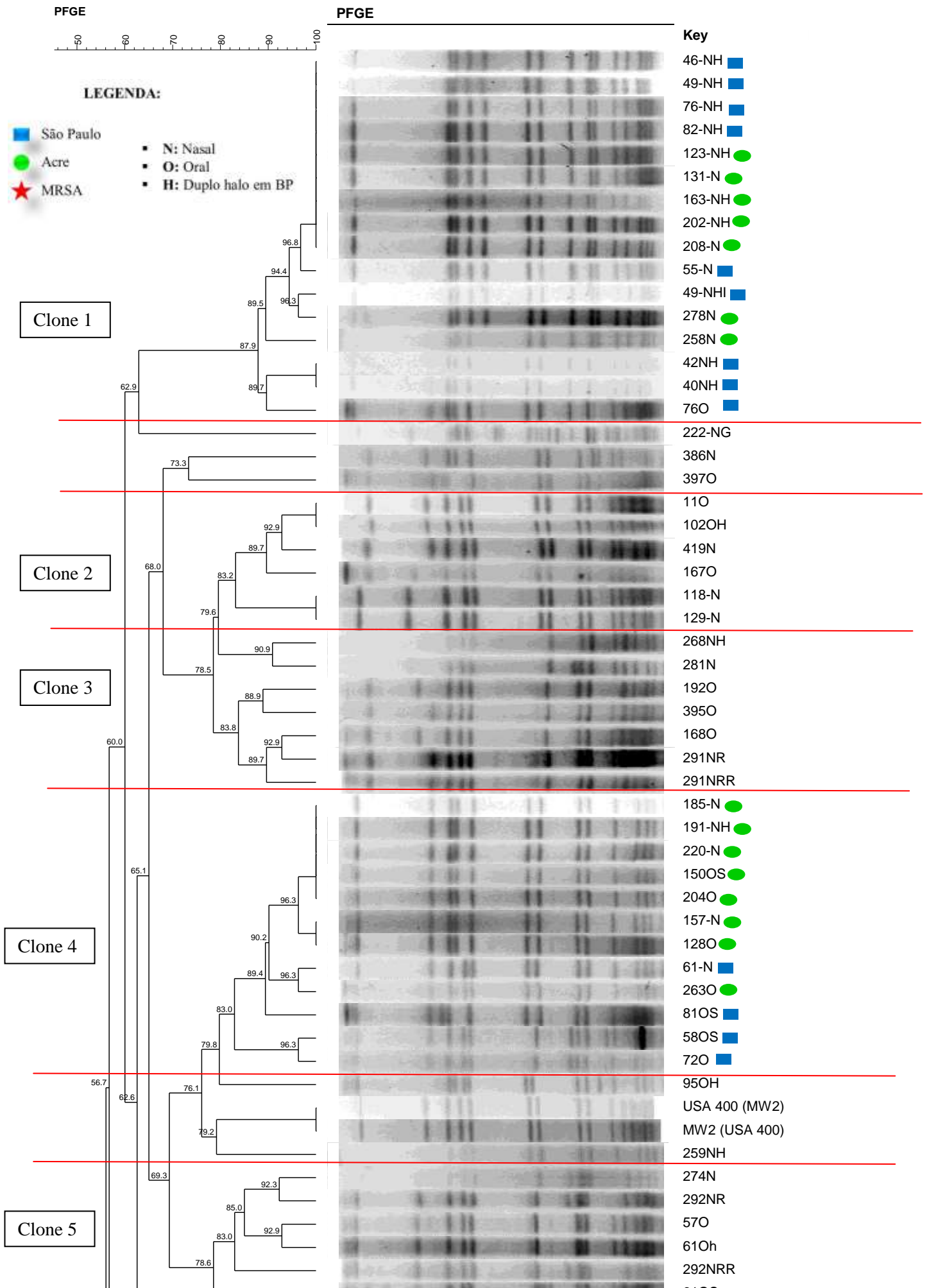
8.8 Identificação do Perfil clonal dos isolados de *S. aureus* (tipagem por PFGE)

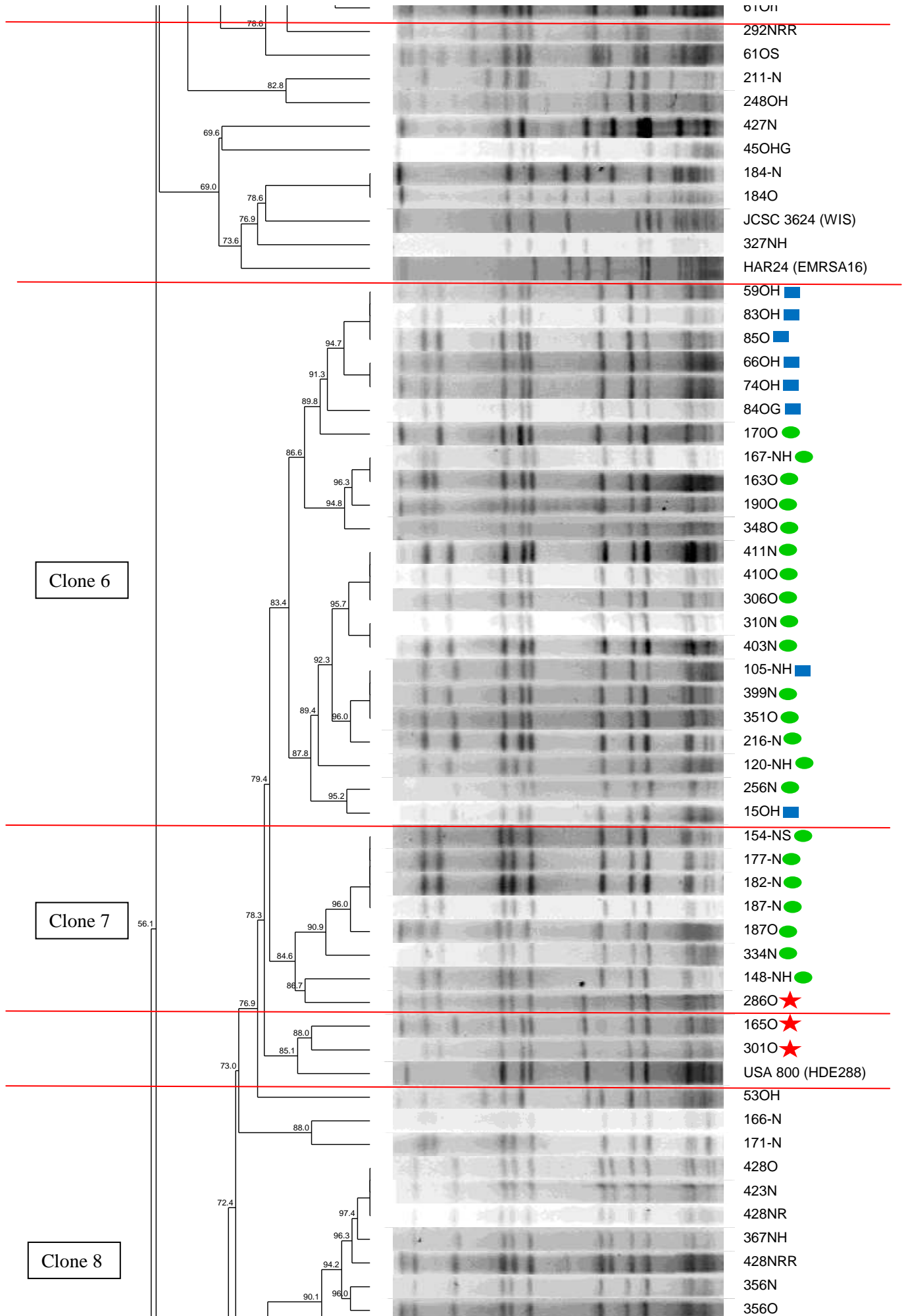
A análise por PFGE permitiu identificar a presença de 21 clusters (1-21) bem definidos e distribuídos entre as populações (Figura 3). Precedendo as análises, considerou-se

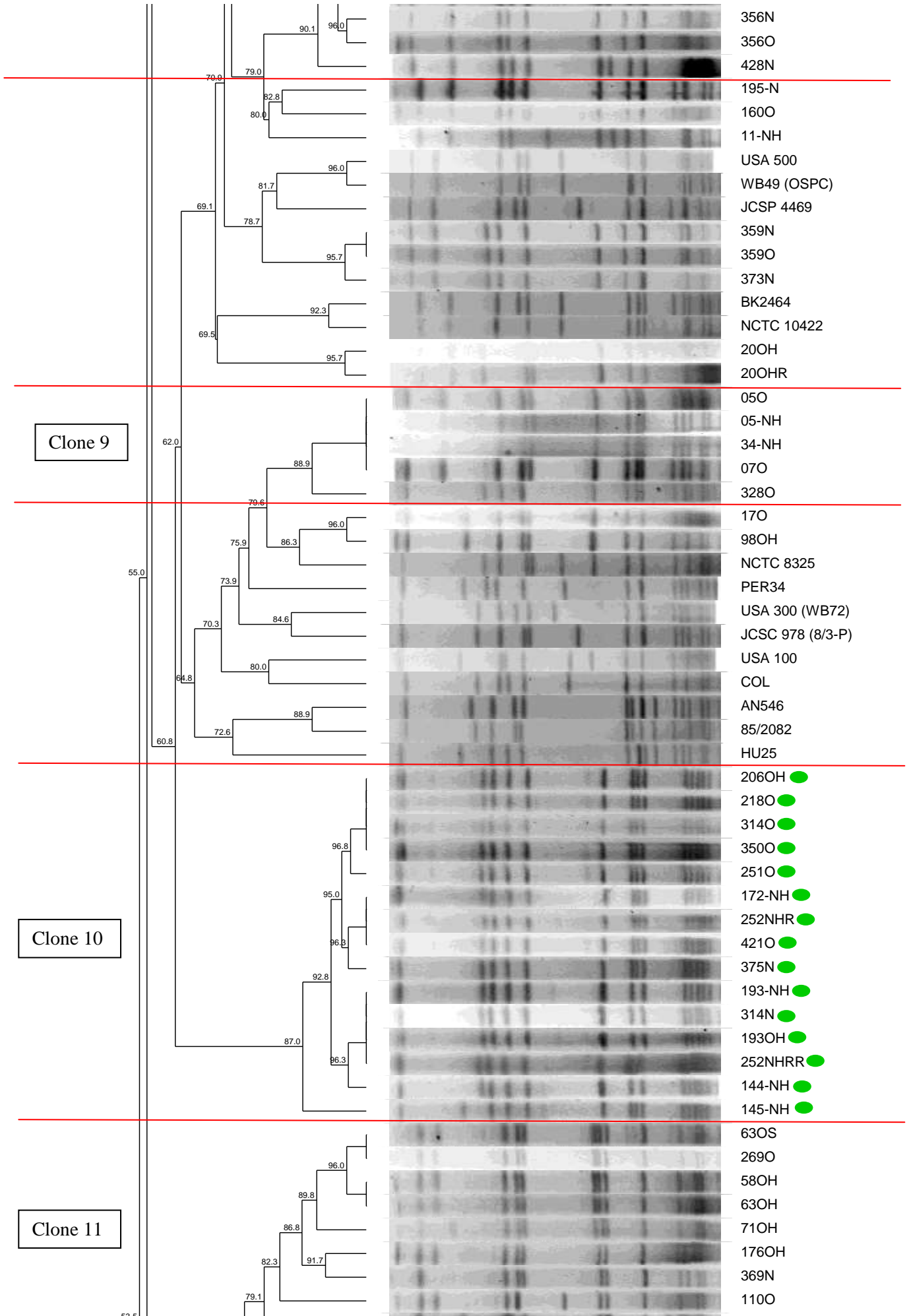
a definição de *cluster* previamente estabelecida (agrupamentos de 4 isolados ou mais, com similaridade $\geq 80\%$). Objetivando a comparação dos agrupamentos com clones internacionais, foram adicionados controles dos mesmos na confecção do dendrograma.

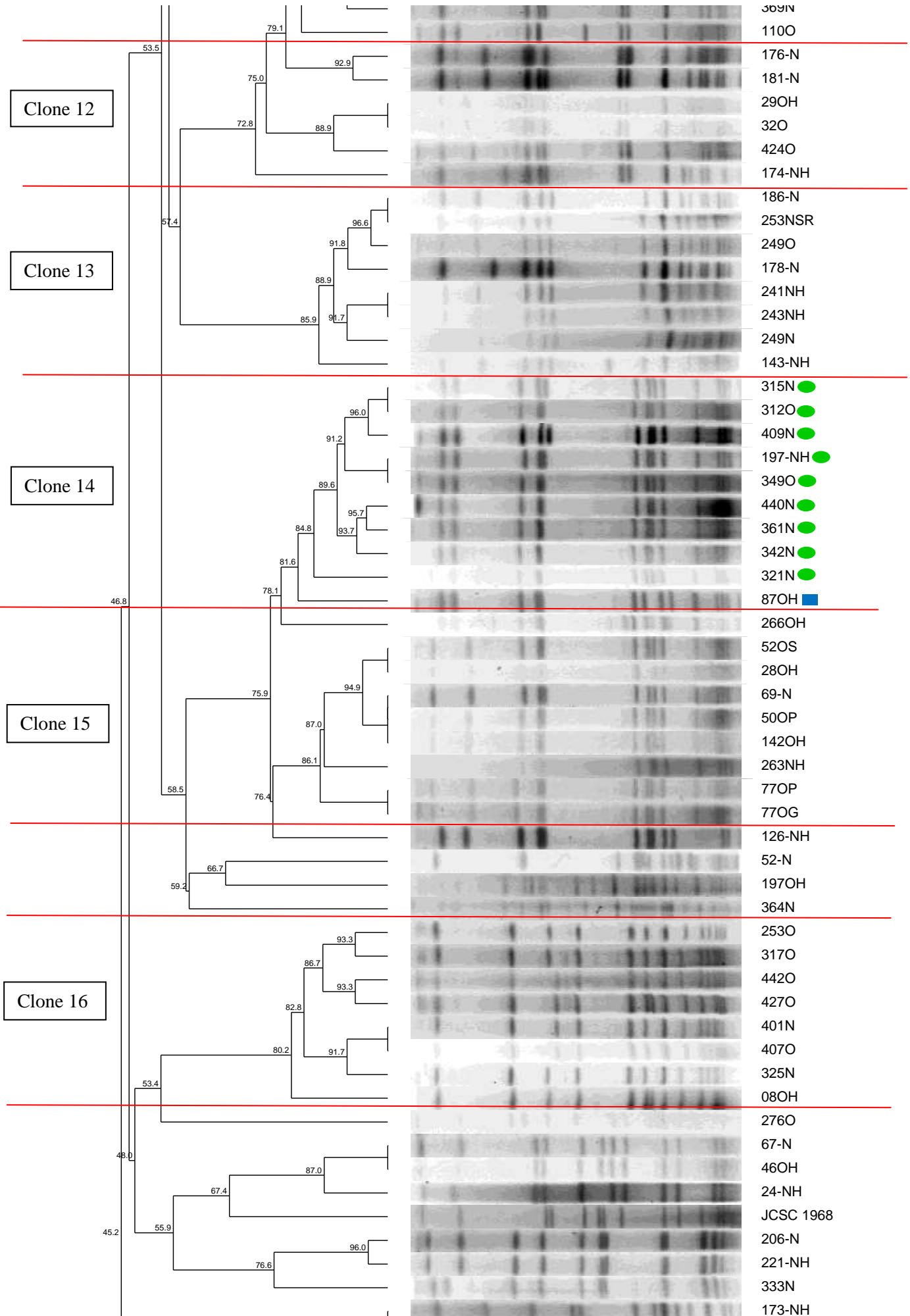
Um total de 190 amostras de *S. aureus* foi analisado pela técnica de PFGE, das quais 35 foram repetidamente não-tipadas. Dos 21 grupos encontrados, foi possível identificar 5 clusters majoritários (1, 4, 6, 10 e 14) que albergaram um número maior de isolados, se destacando como mais prevalentes entre as regiões estudadas. É importante ressaltar que de uma forma inesperada, esses clones principais agruparam amostras provenientes dos indígenas tanto sudeste quanto da região norte do Brasil.

Outro achado importante foi evidenciado no *cluster 7* que, embora não tenha se mantido entre os mais prevalentes, agrupou amostras sensíveis com um dos isolados resistentes. Os isolados resistentes CA-MRSA permaneceram em 2 clones. No primeiro, os isolados agruparam-se com o clone USA800. Em contrapartida, no segundo, houve similaridade apenas entre as 2 estirpes resistentes.









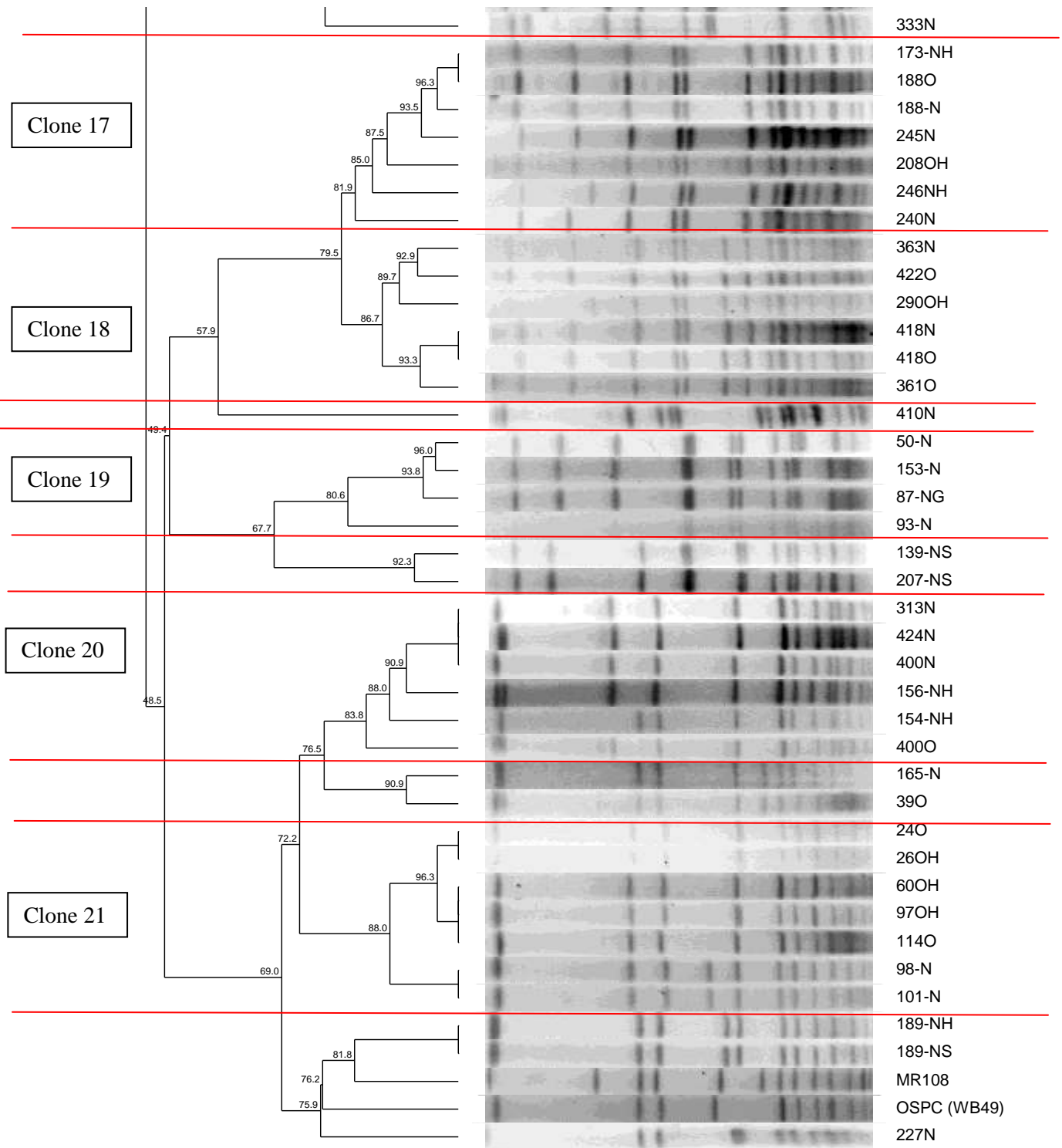


Figura 3. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE - *SmaI* de 190 isolados de *S. aureus* e MRSA provenientes de indivíduos hígidos de populações indígenas no sudeste e norte do Brasil.

8.9 Sequenciamento e análise do MLST (*Multilocus sequence typing*)

Foram selecionadas 17 amostras de *S. aureus* (sensíveis e resistentes) pertencentes aos clusters majoritários (que reuniram o maior número de amostras) identificados pela técnica de PFGE (figura 4). A análise por *multilocus sequence typing*, realizada através do sequenciamento dos *housekeeping genes*, identificou a prevalência do ST 5 na maioria das amostras analisadas, totalizando 23,5% (4 isolados). Além desse, foram evidenciados o ST 1 (1), ST 25 (2), ST 15 (1), ST 97 (2), ST8 (2), ST 1635 (1), ST 188 (2), ST 6 (1) e o ST 707 (1).

Os resultados obtidos através do algoritmo *e-BURST* evidenciaram uma origem ancestral em todos os STs encontrados entre os indígenas, ou seja, os STs que fazem parte do genótipo fundador ou sub fundador, ocupando o centro do diagrama, como pode ser visto na figura 5.

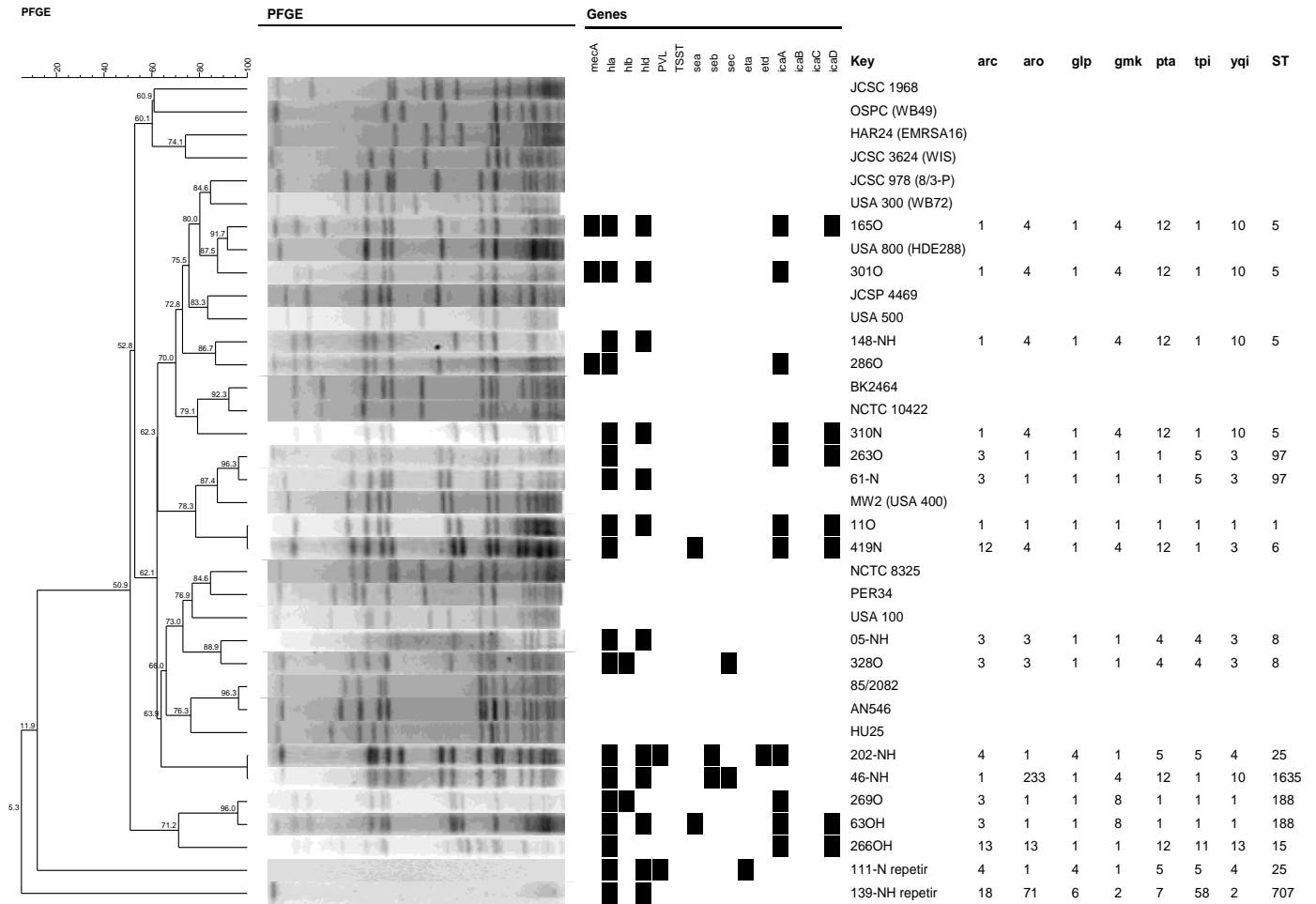


Figura 4. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE - *SmaI* de isolados de *S. aureus* e MRSA dos principais clusters identificados entre as populações indígenas no sudeste e norte do Brasil. (Dice; Optimization: 0.5 %; Tolerance: 1.25 %)

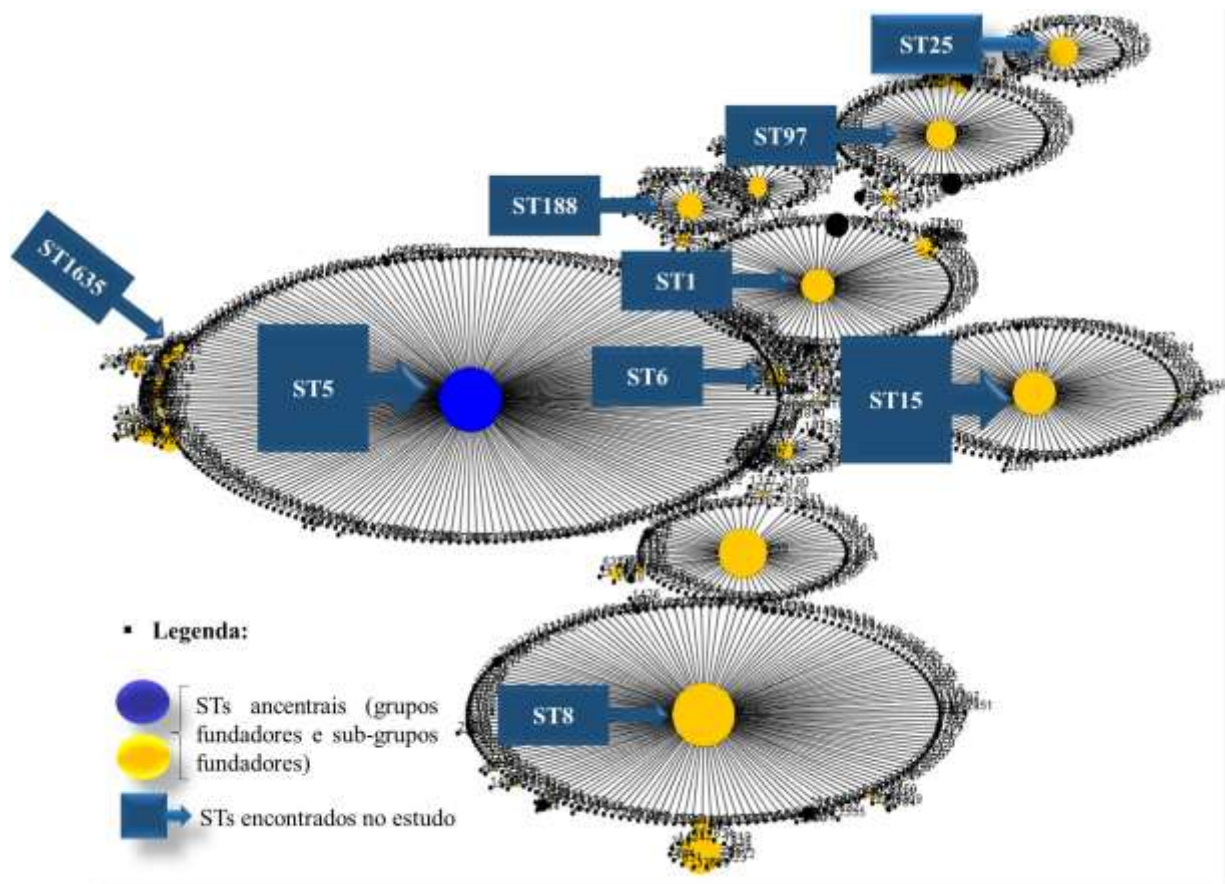


Figura 5. eBURST de *S. aureus* baseado nos STs representados pelos isolados contidos no banco de dados on-line *S. aureus* MLST, incluindo os STs isolados de indígenas das populações do sudeste e norte do Brasil submetidos à técnica de MLST (<http://saureus.mlst.net>).

8.10 Identificação dos fatores de risco

O Modelo de Regressão de Poisson para análise dos fatores de risco associados ao carregamento de *S. aureus* revelou na análise univariada uma associação positiva com os fatores Idade e Número de banhos. Quando observada a variável Etnia, na qual se utilizou como referência o grupo Shanenawa (maior grupo dentre os indígenas estudados) pode-se identificar uma associação negativa entre etnias Tereguá e Kaxinawá relacionadas ao desfecho (tabela 4). A etnia Shanenawa mostrou associação positiva com o carregamento por *S. aureus* quando analisada como variável dicotômica. Dessa forma, foi utilizada como referência em relação as demais.

Em contrapartida, na análise multivariada, o único fator independente associado com o desfecho foi Etnia. Já a variável Idade apresentou um p valor marginalmente significante

($p=0,08$). Embora os fatores Idade e Número de Banhos não tenham se mantido no modelo multivariado, tratam-se de características que parecem contribuir com o desfecho estudado (tabela 4).

Levando-se em consideração o poder de associação da variável Etnia com o desfecho, foram realizadas análises univariadas comparando a prevalência dos fatores de virulência associada aos tipos de Etnias no intuito de conhecer as diferenças de patogenicidade entre os espécimes de *S. aureus* que colonizam os grupos indígenas do estudo. Nessa mesma perspectiva, foram analisados os fatores de risco (hábitos e costumes), e as variáveis demográficas (renda e número de moradores na residência) associados ao carregamento de *S. aureus* distribuídos por Etnias. Os resultados mostram que a etnia Shanenawa se destaca em relação a prevalência dos genes de virulência como também relação a prática das variáveis relacionadas aos hábitos, costumes e demográficas que foram pontuadas (tabela 5 e 6).

Foram considerados como estatisticamente significantes os dados com p valor $< 0,05$.

Tabela 4. Modelo de Regressão de Poisson para análise dos fatores de risco associados ao carreamento de *S. aureus*.

Preditores	Análise Univariada				Análise multivariada	
	S. aureus	Negativo	RP (IC 95%)	P VALOR	RP (IC 95%)	P VALOR
Var Demográficas						
Sexo Feminino	113 (59,5)	112 (53,6)	1,12 (0,93-1,35)	0,24		
Idade, Mediana(Quartis)	21 (11,5 -34)	27 (14-43)	...	0,003*	0,99 (0,98-1,00)	0,08
Etnia						
<i>Shanenawa</i> (referência)*	78 (41,1)	57 (27,3)
<i>Puyanawas I</i>	22 (11,1)	30 (14,4)	0,73 (0,52-1,04)	0,06	0,74 (0,46-1,20)	0,22
<i>Kaxinawa</i>	16 (8,4)	34 (16,3)	0,55 (0,36 - 0,85)	0,002*	0,55 (0,32-0,94)	0,03*
<i>Kopenoti</i>	31 (16,3)	33 (15,8)	0,84 (0,63 - 1,12)	0,22	0,87 (0,57-1,32)	0,52
<i>Teregua</i>	19 (10,0)	33 (15,8)	0,63 (0,43-0,93)	0,009*	0,67 (0,40-1,11)	0,11
<i>Ashaninka</i>	4 (2,1)	1 (10,5)	1,34 (0,87 - 2,20)	0,32	1,32 (0,48-3,62)	0,58
<i>Puyanawas II</i>	21 (11,1)	21 (10,1)	0,87 (0,62 - 1,21)	0,38	0,91 (0,56-1,38)	0,7
Grupo (São Paulo x Acre)	50 (26,3)	66 (31,6)	0,89 (0,73-1,08)	0,25		
Renda em R\$, mediana (quartis)	688 (430-800)	700 (422-815)		0,97		
Escolaridade						
<i>Analfabeto</i> (referência)	13 (6,8)	23 (11,0)		
<i>Fund. Incompleto</i>	77 (40,5)	91 (43,5)	1,27 (0,80 - 2,002)	0,29		
<i>Fund. Completo</i>	56 (29,5)	46 (22,0)	1,52 (0,45 - 2,43)	0,052		
<i>Med. Completo</i>	39 (20,5)	41(19,6)	1,35 (0,83 - 2,20)	0,21		
<i>Sup. Completo</i>	5 (2,6)	8 (3,8)	1,07 (0,47 -2,40)	1,0		
Habitação de alvenaria	60 (31,6)	71 (33,9)	0,95 (0,78-1,16)	0,61		
Rede de esgoto	85 (44,7)	83 (39,7)	1,10 (0,91 -1,51)	0,31		

Continuação

Análise Univariada P VALOR	Análise multivariada RP (IC 95%)	Análise Univariada P VALOR	Análise multivariada RP (IC 95%)	Análise		
				Univariada P VALOR	Análise multivariada RP (IC 95%)	Análise Univariada P VALOR
Residentes na habitação, mediana (quartis)	5,5 (4,5-7)	5,0 (3,0-7,5)				
Distância de unidade de saúde, mediana (quartis)	2,5 (2,5-5,0)	2,0 (2,0-5,5)		0,52		
Hábitos e costumes						
Tatuagem	18 (9,4)	24 (11,4)	0,90 (0,68-1,20)	0,62		
Esportes Coletivos	87 (45,7)	93 (44,5)	1,02 (0,84-1,23)	0,80		
Brincos	45 (32,3)	23 (44,2)	0,69 (0,44-1,10)	0,17		
Pigmentacao pele	70 (36,8)	76 (36,3)	1,00 (0,83-1,22)	0,92		
Urucum	55 (29,0)	68 (32,5)	0,92 (0,75-1,12)	0,50		
Genipapo	67 (35,2)	38 (59,3)	0,85 (0,68-1,08)	0,22		
Numero de banhos diários, mediana (quartis)	3,5 (2,5-4,0)	3,0 (2,0-4,0)	...	0,04*		
Banhos Igarape	61 (43,7)	79 (37,8)	0,88 (0,73-1,07)	0,27		
Banhos Chuveiro	131 (68,9)	135 (64,5)	1,09 (0,90-1,32)	0,35		
Consumo de beveragens	33 (17,)	40 (19,1)	0,94 (0,74-1,19)	0,64		
Consumo de aywaska	1 (0,53)	6 (2,87)	0,60 (0,44-0,82)	0,07		
Uso de substâncias topicas medicinais	26 (40,6)	38 (59,3)	0,85 (0,68-1,08)	0,22		
Etilismo	29 (15,2)	32 (15,3)	0,99 (0,77-1,29)	0,98		

Continuação

Análise Univariada	Análise multivariada	Análise Univariada	Análise multivariada	Análise		
				Univariada	Análise multivariada	Análise Univariada
P VALOR	RP (IC 95%)	P VALOR	RP (IC 95%)	P VALOR	RP (IC 95%)	P VALOR
Tabagismo	34 (17,8)	42 (20,1)	0,93 (0,74-1,17)	0,57		
Variáveis clínicas						
Diabetes	8 (4,2)	11 (5,2)	0,90 (0,60-1,33)	0,62		
Infecções Pele A	3 (1,58)	2 (0,96)	1,31 (0,44-3,85)	0,57		
Infecções Pele R	6 (3,16)	8 (3,83)	0,91 (0,57-1,45)	0,71		
Antibióticos	22 (11,5)	19 (9,0)	1,14 (0,81-1,61)	0,41		
Consultas ambulatoriais recentes	32 (16,8)	26 (12,4)	1,19 (0,88-1,61)	0,21		
Cirurgia	17 (8,95)	11 (5,26)	1,35 (0,84-2,17)	0,15		
Internação	27 (14,2)	34 (16,2)	0,92 (0,72-1,18)	0,56		
Pneumonia	1 (0,53)	1 (0,48)	1,04 (0,26 - 4,20)	0,94		

Dados em número (%). RR, Rate Ratio (Razão de Prevalências); IC Intervalo de Confiança.*Dados estatisticamente significantes

Tabela 5. Resultados de análise univariada dos fatores de virulência (prevalência de genes) associada aos tipos de Etnias.

Análise Univariada - ETNIAS – Acre & São Paulo															
Genes	Shanenawa (%)		Poyanawa I (%)		Kaxinawa (%)		Ashaninka (%)		Poyanawas II (%)		Kopenoti - Sp (%)		Teregua – Sp (%)		P VALOR
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
<i>S. aureus</i>															
<i>(sau)</i>	78 (41,1)	57 (27,3)	21 (11,1)	30 (14,4)	16 (8,4)	34 (16,3)	4 (2,1)	1 (0,5)	21 (11,1)	21 (10,0)	31 (16,3)	33 (15,8)	19 (10,0)	33 (15,8)	0,01*
<i>Sea</i>	7 (38,9)	72 (41,6)	1 (5,6)	20 (11,6)	-	16 (9,2)	1 (5,6)	3 (1,7)	1 (5,6)	20 (11,6)	6 (33,3)	25 (14,5)	2 (11,1)	17 (9,8)	0,27
<i>Seb</i>	10 (37,0)	69 (42,1)	1 (3,7)	20 (12,2)	3 (11,1)	13 (7,9)	-	4 (2,4)	2 (7,4)	19 (11,6)	7 (25,9)	24 (14,6)	4 (14,8)	15 (9,1)	0,47
<i>Sec</i>	18 (47,4)	61 (39,9)	5 (13,2)	16 (10,5)	3 (7,9)	13 (8,5)	3 (7,9)	1 (0,7)	4 (10,5)	17 (11,1)	5 (13,2)	26 (17,0)	-	19 (12,4)	0,03*
<i>Hla</i>	75 (40,8)	4 (57,1)	20 (10,9)	1 (14,3)	15 (8,2)	1 (14,3)	4 (2,2)	-	20 (10,9)	1 (14,3)	31 (16,8)	-	19 (10,3)	-	0,81
<i>Hld</i>	66 (42,9)	13 (35,1)	13 (8,4)	8 (21,6)	11 (7,1)	5 (13,5)	3 (1,9)	1 (2,7)	14 (9,1)	7 (18,9)	29 (18,8)	2 (5,4)	18 (11,7)	1 (2,7)	0,02*
<i>PVL</i>	14 (38,9)	65 (41,7)	3 (8,3)	18 (11,5)	2 (5,6)	14 (9,0)	1 (2,8)	3 (1,9)	5 (13,9)	16 (10,3)	9 (25,0)	22 (14,1)	2 (5,6)	18 (11,5)	0,62
<i>Eta</i>	5 (71,4)	74 (40,2)	-	21 (11,4)	1 (14,3)	15 (8,2)	-	4 (2,2)	-	21 (11,4)	1 (14,3)	30 (16,3)	-	19 (10,3)	0,62
<i>Etd</i>	5 (38,5)	74 (41,6)	-	21 (11,8)	2 (15,4)	14 (7,9)	-	4 (2,2)	-	21 (11,8)	6 (46,2)	25 (14,0)	-	19 (10,7)	0,03
<i>TSST-1</i>	1 (8,3)	75 (43,6)	-	21 (12,2)	-	15 (8,7)	-	3 (1,7)	-	20 (11,6)	4 (33,3)	26 (15,1)	7 (58,3)	12 (7,0)	< 0,01*
<i>icaA</i>	65 (41,4)	14 (41,2)	20 (12,7)	1 (2,9)	15 (9,6)	1 (2,9)	-	4 (11,8)	20 (12,7)	1 (2,9)	22 (14,0)	9 (26,5)	15 (9,6)	4 (11,8)	< 0,01*
<i>icaD</i>	53 (38,1)	26 (50,0)	17 (12,2)	4 (7,7)	13 (9,4)	3 (5,8)	1 (0,7)	3 (5,8)	20 (14,4)	1 (1,9)	21 (15,1)	10 (19,2)	14 (10,1)	10 (19,2)	0,04*

Dados em número (%). Positivo: *S. aureus*. *Dados estatisticamente significantes.

Tabela 6. Resultados da análise univariada dos fatores de risco associados ao carregamento de *S. aureus* distribuídos por Etnias.

Hábitos e Costumes	ETNIAS - São Paulo & Acre														P VALOR
	Shanenawa (%)		Poyanawa I (%)		Kaxinawa (%)		Kopenoti (%)		Teregua (%)		Ashaninka (%)		Poyanawas II (%)		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Pigmentacao Pele	76 (52,1)	59 (23,3)	22 (15,1)	29 (11,5)	26 (17,8)	24 (9,5)	-	64 (25,6)	-	52 (20,6)	5 (3,4)	-	17 (11,6)	25 (9,9)	< 0,01*
Beberragens**	39 (53,4)	96 (29,4)	19 (26,0)	32 (9,8)	7 (9,6)	43 (13,2)	-	64 (19,6)	1 (1,4)	51 (15,6)	2 (2,7)	3 (0,9)	5 (6,8)	37 (11,3)	< 0,01*
Banho Igarape	68 (48,6)	67 (25,9)	15 (10,7)	36 (13,9)	43 (30,7)	7 (2,7)	-	64 (24,7)	-	52 (20,1)	5 (3,6)	-	9 (6,4)	33 (12,7)	< 0,01*
Nº de Banhos mediana (Quartis)	3,2 (1-4)		3,1 (1-4)		3,2 (1-4)		1,7 (1-4)		2,1 (1-4)		3,0 (2-4)		3,5 (2-4)		
Renda R\$, mediana (Quartis)	696 (50-4000)		781 (70-3550)		505 (60-2000)		810 (134-4000)		1013 (300-2500)		710 (250-1400)		837 (649-4000)		< 0,01*
Residentes na habitação, mediana (quartis)	6,3 (1-20)		4,0 (1-9)		6,0 (2-11)		4,6 (1-9)		3,9 (1-6)		8,0 (8-8)		5,2 (2-11)		< 0,01*

Dados em número (%). Positivo: *S. aureus*. *Dados estatisticamente significantes.

**Mistura de ervas medicinais tipicamente utilizadas pelos indígenas para tratamento empírico de doenças.

9. DISCUSSÃO

Em dias atuais, a resistência bacteriana é destacada pela OMS como uma grande ameaça global. Sabidamente, um dos protagonistas desse cenário tem sido *Staphylococcus aureus* por ser capaz de causar uma ampla gama de infecções que se estendem desde quadros superficiais até infecções generalizadas de alta letalidade. No passado, cepas de *S. aureus* e MRSA estavam confinadas a configurações hospitalares.⁽⁸⁴⁾ No entanto, impulsionados pelos grandes avanços tecnológicos, junto aos esforços para melhoria das medidas de controle de infecção, hoje se vivencia uma realidade distinta. De um lado, no âmbito hospitalar, é possível se deparar com menores taxas desses agentes, e de outro, no ambiente comunitário, se enfrenta uma constante emergência desse patógeno, que por sua vez só agrava a magnitude desse grande problema de saúde pública.⁽⁸⁵⁾

Acredita-se que as infecções estafilocócicas sejam precedidas pelo processo de colonização. Estudos revelam que aproximadamente um terço de adultos hígidos colonizados apresentam risco significativo de infecções invasivas subsequentes.^(23,86) Outros fatores que prometem exercer impacto sobre a ocorrência de doenças infecciosas são o tipo de raça, a etnia e o nível socioeconômico de cada indivíduo. Em comparação aos caucasianos, os afro-americanos e americanos nativos são mais propensos a desenvolver quadros de bacteremia.⁽¹⁶⁾ O mesmo foi observado entre indígenas australianos que apresentaram taxas de infecção significativamente maiores do que populações não-indígenas.⁽¹⁶⁾

Embora o Brasil seja um país com grande número de populações indígenas (817.963 indivíduos)⁽⁸⁷⁾, pouco se sabe sobre a dinâmica das infecções nesse panorama, em especial em relação à colonização e infecção por *Staphylococcus aureus*. Dados apresentados por Coimbra Júnior há pouco mais de 30 anos atrás, evidenciaram através de estudo com piodermite e portadores de *S. aureus* (nasais e orais) em populações indígenas em Rondônia taxas de 23,3 e 36,2% *S. aureus* entre as aldeias estudadas.⁽⁸⁸⁾

No entanto, registros do estudo em questão revelaram taxas de carreamento nasal e oral por *S. aureus* de 47,6%, de modo que, quando realizada a análise por região, obteve-se entre os isolados provenientes dos indígenas da população sudeste um total de 43,1% de *S. aureus*, e em relação à população do norte, um percentual de 49,4 %, totalizando 190 estirpes. Frente ao percentual de amostras resistentes à meticilina (CA-MRSA), evidenciou-se uma prevalência de 0,7%, a qual se restringiu entre os isolados de indígenas pertencentes à região amazônica do Brasil, todos albergando SCCmec IV.

Outro estudo recente realizado entre a população de ameríndios de *Wayampi* na aldeia de *Trois-Sauts*, região isolada na Floresta amazônica da Guiana Francesa, avaliou as taxas de carregamento nasal de *S. aureus* e colonização persistente entre os anos de 2006 e 2008. Os achados revelaram no ano de 2006 uma prevalência de carregamento da bactéria de 41,7%, enquanto em 2008 as taxas subiram para 57,8%, sendo que 26% dos indivíduos eram colonizados de forma persistente. Nesse estudo, nenhum dos isolados se mostrou resistente à Meticilina.⁽⁸⁹⁾

Nota-se que a prevalência de *S.aureus* entre os indígenas brasileiros chega a ser quase 10% menor do que as taxas evidenciadas entre os *Wayampis* e aborígenes australianos, os quais apresentaram percentual de 58% a partir de amostras de *swabs* de garganta e lesões de pele. Nesse estudo com os aborígenes, pôde-se detectar 23% de isolados resistentes.⁽⁵²⁾ Já outro trabalho também com a população aborígine revelou presença de MRSA em 61% das amostras contra 33% da população não-indígena.⁽⁵⁵⁾ Em inquérito de base populacional realizado no estado de São Paulo em população não-indígena, as taxas de carregamento nasal de *S. aureus* e CA-MRSA foram de 32,7% e 0,9%, respectivamente. Nesse trabalho todos os isolados resistentes também albergaram o SCC*mec* IV.⁽⁹⁰⁾

Levando-se em consideração os dados entre populações indígenas e não indígenas do Brasil, entende-se que as taxas de colonização tanto por *S. aureus* quanto MRSA parecem ser similares, porém, dentre os índios estudados a taxa de colonização por *S. aureus* foi superior por volta de 15% se comparadas à população não-indígena previamente estudada.⁽⁹⁰⁾

Conforme citado, o presente trabalho evidenciou uma tímida taxa de resistência entre as cepas de *S. aureus* isoladas de indígenas brasileiros, sendo três isolados (orais) totalizando 0,7%. Esse achado contrapõe dados previamente descritos entre indígenas americanos e aborígenes australianos, nos quais as taxas foram consideravelmente superiores.^(49,54)

Os isolados de CA-MRSA foram identificados tanto por métodos fenotípicos através da técnica de disco-difusão quanto por métodos genotípicos pela detecção do gene *mecA* através da PCR em Tempo Real (Real Time PCR). Vale destacar que o CLSI⁽⁷⁰⁾ tem recomendado o disco de Cefoxitina para detecção de resistência à metilina. Além de ser um potente indutor do sistema regulatório do gene *mecA*, a droga apresenta maior sensibilidade como teste de *screening* para identificar amostras carreadoras do gene de resistência.⁽⁹¹⁾ Os resultados apresentados pela técnica de disco-difusão mostraram-se em consonância com a afirmativa. Ao submeter isolados de MRSA à avaliação da susceptibilidade antimicrobiana com outras drogas como Penicilina, Ceftarolina, Quinupristina, Sulfametoxazol, Clindamicina, Eritromicina e Levofloxacina, pôde-se notar resistência apenas à Penicilina,

sendo que os isolados se mostraram sensíveis aos demais antimicrobianos testados. Segundo Sader et al., as taxas de sensibilidade de cepas CA-MRSA são geralmente maiores se comparadas ao HA-MRSA, especialmente para Clindamicina e Levofloxacina, o que também tem se observado com a Ceftarolina, droga recentemente introduzida no mercado como opção para tratamento de infecções causadas por MRSA.⁽⁹²⁾

Assim como realizado por Pereira-Franchi,⁽⁹³⁾ foi possível aplicar um protocolo rápido de identificação de amostras MRSA pela técnica da PCR em tempo real. Em virtude da dificuldade muitas vezes encontrada para o tratamento de infecções por MRSA, sabe-se da necessidade de ferramentas para diagnóstico rápido e preciso que são cruciais para a escolha direcionada dos antibióticos, a fim de se garantir o tratamento adequado das infecções.⁽⁹⁴⁾

Em relação à análise dos fatores de risco para carreamento de *S. aureus* realizada no presente estudo, pôde-se constatar que etnia foi a única variável independente que permaneceu no modelo multivariado pelo teste de regressão de Poisson. Ruimy et al., não encontraram nenhuma associação com fatores epidemiológicos, porém, identificaram que fatores genéticos podem estar associados com a colonização por *S. aureus*.⁽⁸⁹⁾ Como já citado, a origem racial também se encontra dentre os fatores predisponentes para colonização pelo agente estudado.⁽¹⁶⁾

Ao proceder as análises univariadas, comparando a prevalência dos genes de virulência associada aos tipos de etnias e analisando os fatores de risco (hábitos, costumes e demográficos) associados ao carreamento de *S. aureus*, também distribuídos por etnias, obtiveram-se resultados significantes com os genes *sec*, *hld*, *tst*, *icaA* e *icaD*. Em relação aos fatores hábitos, costumes e demografia, todas as variáveis testadas foram estatisticamente significantes: pigmentação da pele, número de banhos, beberragens, banhos no igarapé, renda mensal e número de moradores na casa.

Vale ressaltar que a etnia Shanenawa, utilizada como referência para as demais, além de mostrar associação positiva com o carreamento por *S. aureus* (quando testada como variável dicotômica), foi o grupo que carreou cepas de *S. aureus* mais virulentas e resistentes (4). Comumente, essa etnia apresenta de forma mais frequente hábitos, costumes e fatores demográficos que podem estar associados com maior prevalência de colonização pelo microrganismo em questão.

Em relação às variáveis pigmentação da pele, número de banhos, beberragens e banhos no igarapé, mais estudos são necessários para elucidar essa associação.

No presente trabalho, não foram encontrados fatores de risco tradicionais para colonização como idade, sexo masculino, comorbidades, tabagismo e hospitalização recente,

exceto o número de habitantes na residência. ⁽⁹⁵⁾ Embora o fator idade tenha apresentado resultado marginalmente significativo ($p=0,08$), sabe-se que a colonização por *S. aureus* apresenta-se de forma mais frequente em indivíduos jovens, como descrito em estudos anteriores. ^(90,95)

Segundo Hewagama et al., condições de superlotação, habitação, infra-estrutura, higiene e saneamento precários favorecem a disseminação de *S. aureus* virulentos entre as populações, podendo contribuir para o aumento futuro das taxas de infecções nesses cenários. ^(23,96,97)

Quando comparado o fator média de renda mensal em relação à colonização por *S. aureus*, os resultados foram estatisticamente significativos. Em comparação com as demais populações indígenas estudadas, a etnia Shanenawa também esteve entre os grupos com menor renda mensal. Um estudo recente realizado por Uria et al., evidenciou forte associação negativa entre renda per capita e a prevalência de MRSA, indicando que o processo de colonização seja mais frequente em populações socialmente desvantajadas. ⁽⁹⁷⁾

A alta patogenicidade de *S. aureus* está intimamente relacionada a uma ampla gama de fatores de virulência, que vão garantir à bactéria sucesso como colonizantes e agentes de infecção. Tais fatores permitem a adesão da bactéria, favorecem o escape do sistema imune e causam efeitos nocivos às células do hospedeiro. ⁽¹⁸⁾

Em relação à distribuição geral dos fatores de virulência, obteve-se maior prevalência dos genes relacionados às hemolisinas alfa e delta com percentuais mais elevados 96,3 e 80,3%, respectivamente, seguidos pela hemolisina beta com 20,4%. As hemolisinas constituem um dos principais fatores de virulência na patogênese de *S. aureus*, facilitam a disseminação do microrganismo e são responsáveis por causar a lise de hemácias, leucócitos e fibroblastos através da formação de poros nas membranas das células alvo. ^(1,98) Uma pesquisa comparando amostras isoladas a partir de quadros infecciosos entre os países Austria, Hungria e Macedônia revelou taxas das hemolisinas alfa, beta e gama de 86%, 40% e 74%, respectivamente, dados que se assemelham aos achados do presente estudo. ⁽¹⁾

Sabe-se que a maior parte dos isolados de *S. aureus* é capaz de formar o biofilme, que por sua vez aumenta a gravidade das infecções por dificultar a ação dos agentes antibióticos favorecendo o aumento da resistência bacteriana. ^(99,100) A identificação dos genes relacionados à formação de biofilme nesse trabalho, revelou predominância dos genes *icaA* (82,2%) e *icaD* (72,7%). Esses genes constituem-se como fatores necessários para o processo de adesão intracelular, e sendo assim, exercem papel importante na formação multicamada do biofilme. Em estudo realizado com amostras clínicas tanto sensíveis quanto resistentes, as taxas

encontradas em MSSA também foram maiores para os genes *icaA* (71%) e *icaD* (54,0%), assim como outras pesquisas tem evidenciado. Nesse trabalho de Ghasemian et al., houve relação entre a formação fenotípica do biofilme e a prevalência dos genes *icaA* e *icaD*, fato que corrobora o potencial patogênico de isolados de *S. aureus* carreadores desses genes. ⁽¹⁰¹⁾
(102)

Os achados obtidos nesse estudo evidenciaram 36 (13,5%) amostras PVL positivas, nenhuma associada com CA-MRSA. A prevalência desse gene se deu em especial entre os indígenas situados no Acre. Em estudo previamente realizado com população não-indígena, identificaram-se apenas 5 amostras albergando o gene que codifica a Leucocidina de Pantón-Valentine, totalizando 2,2%. ⁽¹⁰³⁾ Considerando as condições peculiares de vida das populações indígenas supracitadas, é possível inferir que tais fatores podem contribuir para carreamento de *S. aureus* e a ocorrência de infecções de pele associadas ao gene da PVL (*lukS-PV*). ⁽¹⁰⁴⁾ Segundo Boan et al., as infecções por cepas de *S. aureus* PVL positivas afetam desproporcionalmente indivíduos jovens, indígenas, ou sujeitos com menos fatores de risco relacionados à assistência em saúde. ⁽¹⁰⁴⁾

Os genes codificadores das toxinas esfoliativas foram detectados em percentual menor 3,6 e 6,8%. Segundo Koosha et al., ⁽¹⁰⁵⁾ a frequência destes fatores de virulência podem diferir de acordo com a região estudada. ⁽¹⁰⁶⁾ Em amostras comunitárias de *S. aureus* advindas de população não indígenas, o percentual de toxinas esfoliativas foi de 1,3%. ⁽¹⁰²⁾

Um dado interessante, foi que a prevalência do gene codificador da toxina 1 da síndrome do choque tóxico se concentrou entre os indígenas das aldeias do estado de São Paulo. O gene da TSST-1 tem sido frequentemente associado com isolados MSSA, no entanto, nos últimos anos pode-se observar um aumento dos casos em cepas resistentes. ⁽¹⁰⁷⁾ Dentre os indígenas da região sudeste, foram identificados apenas estirpes sensíveis de *S. aureus*, que apesar do maior percentual de genes relacionados à toxina 1 da síndrome do choque tóxico, foram amostras que se mostraram menos virulentas em relação as isoladas dentre os indígenas da região amazônica.

Em conjunto com os genes codificadores das hemolisinas, os genes envolvidos com a produção do biofilme e demais toxinas mostram uma diversidade no perfil de virulência identificado em *S. aureus* isolados de populações indígenas, resultados similares aos já identificados em população não-indígena. ⁽¹⁰²⁾ Esses dados reafirmam a importância epidemiológica direcionada aos indivíduos sabidamente colonizados por *S. aureus*.

Quanto à clonalidade dos isolados, a análise por PFGE permitiu identificar 21 *clusters* bem definidos circulantes entre as populações indígenas no sudeste e norte brasileiro. Desses,

5 clusters majoritários (1, 4, 6, 10 e 14) albergaram um número maior de isolados que se destacaram como mais prevalentes entre as regiões estudadas. Um achado digno de nota foi observado entre esses *clusters*, onde amostras de indígenas do sudeste se agruparam (com mais de 80% de similaridade) com isolados identificados na região amazônica. Tratando-se da distância entre ambas regiões, estimada em torno de 3.961 km, é difícil associar fatores em comum entre as populações estudadas. No entanto, curiosamente houve o deslocamento de um profissional de saúde do interior de São Paulo para região amazônica, local onde se manteve por 7 anos prestando assistência às aldeias localizadas no Alto do Rio Juruá, que compõem parte da população desse estudo. É notório que o carreamento e a disseminação de cepas de *S. aureus* e MRSA através do processo de colonização é passível de acontecer, sendo, nesse caso, um evento a ser explorado. Outra hipótese seria a possibilidade desses isolados partilharem de uma origem comum. ⁽⁵³⁾

Em estudos com populações humanas é frequente a diversidade clonal entre cepas *S. aureus*, especialmente tratando-se de isolados sensíveis à meticilina. ^(53,108)

Outro achado que merece atenção foi evidenciado entre o agrupamento 7, que embora não tenha se mantido entre os mais prevalentes reuniu amostras sensíveis com um dos isolados resistentes pertencente ao ST5. De acordo com Robinson e Enright, a disseminação de genótipos não se dá apenas entre indivíduos, mas também pela capacidade de disseminação do elemento genético móvel SCC*mec* IV através de estripes de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA).⁽⁵³⁾ As demais amostras de CA-MRSA agruparam-se com o clone USA800. O clone USA800 é um HA-MRSA dominante no mundo inteiro, conhecido como Clone Pediátrico. ⁽¹⁰⁹⁾

Os STs identificados entre as populações indígenas estudadas assemelham-se aos *sequence typings* comumente disseminados em diversos outros tipos de populações. ^(110–112) Quando realizada análise pelo MSLT, identificou-se prevalência do complexo clonal ST 5 na maioria das amostras analisadas (4 isolados). O ST5 é conhecido como um dos complexos clonais mais prevalentes tanto em ambiente hospitalar quanto comunitário. Associa-se com diferentes tipos de SCC*mec* (I, II e IV) e representa o ancestral do clone descrito como clone Cordobês/Chileno e do clone epidêmico pediátrico MRSA detectado desde 1999. ^(80,113)

Além desse, foram evidenciados o ST 1, ST 25, ST 15, ST 97, ST8, ST 1635, ST 188, ST 6 e o SLV 707. O ST8 está associado com o clone USA300, o principal clone comunitário relacionado a infecções de pele e tecidos moles no Norte da América. ^(114,115)

Desde o final da década de 1960, cinco principais clones epidêmicos de MRSA têm se disseminado e causado infecções em diferentes regiões do mundo; dentre eles, estão ST5,

ST8, ST22, ST36 e ST45. ⁽²⁹⁾ No entanto, alguns clones mais distintos, como o clone ST152 de Bamako (Mali), ou o complexo clonal CC75, têm sido encontrados entre aborígenes de regiões remotas do norte da Austrália. ⁽⁸⁹⁾ Tong et al., ⁽⁸⁴⁾ revela em estudo que analisou a disseminação de CA-MRSA entre indígenas a prevalência do ST22 e ST772. Por outro lado, na pesquisa realizada com ameríndios da região amazônica de Guiana Francesa, 78,5% dos portadores de *S. aureus*, albergavam STs mais comuns, incluindo o ST1, ST5, ST15, ST97, ST188, ST1293 e ST1292, enquanto que apenas 2 (3%), incluíam o ST30 e ST398. ⁽⁸⁹⁾

Um dos isolados identificados no presente estudo apresentou o ST97. Esse complexo está relacionado com ruminantes, em especial bovinos. Além de estar associado com a maioria dos casos de mastite bovina, recentemente foi descrito entre suínos. ⁽¹¹⁶⁾ Outro *sequence typing* pouco prevalente foi o ST 707, identificado em amostras hospitalares e comunitárias de *S. aureus* isoladas em Burkina Faso, um país de baixa renda da África Ocidental. ⁽¹¹⁷⁾

A análise pelo algoritmo *eBURST* evidenciou uma origem ancestral em todos os STs encontrados entre os indígenas, ou seja, STs constituindo o genótipo fundador ou sub fundador. De acordo com Gutierrez e Linz, populações que vivem sob condições isoladas e clones de *S. aureus* altamente divergentes podem refletir antigas migrações humanas e/ou em processo de evolução entre bactérias e o hospedeiro como já descrito para outros microrganismos. ^(108,118)

10. CONCLUSÃO

O presente trabalho traz dados pioneiros acerca da epidemiologia de *Staphylococcus aureus* e MRSA em meio aos indígenas brasileiros. As taxas distintas de prevalência de carreamento tanto de *S. aureus* quanto de MRSA, bem como da disseminação de determinados genes de virulência em isolados de *S. aureus*, parecem evidenciar uma dinâmica peculiar do microrganismo entre os indígenas brasileiros. Estes são achados que, no entanto, não contrastam de forma importante dos dados descritos previamente em população não-indígena. A análise do perfil clonal impulsiona a elucidação de questões relacionadas ao processo de evolução da bactéria estudada, sugerindo uma provável origem comum. Por fim, os resultados epidemiológicos nos permitem inferir que o fator etnia está relacionado à prevalência de *S. aureus* em populações especiais (no qual se destacou o grupo Shanenawa), e que, associados os hábitos e costumes peculiares, condições precárias de habitação, higiene e saneamento, podem exercer influência sobre o carreamento e disseminação de *Staphylococcus aureus* em populações humanas.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waryah CB, Gogoi-tiwari J, Wells K, Eto KY, Masoumi E, Costantino P, et al. Diversity of Virulence Factors Associated with West Australian Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates of Human Origin. 2016;2016.
2. Smith TC, Forshey BM, Hanson BM, Wardyn SE, Moritz ED. Molecular and epidemiologic predictors of *Staphylococcus aureus* colonization site in a population with limited nosocomial exposure. *Am J Infect Control* [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 Jan 20];40(10):992–6. Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418604>
3. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Acesso em: 03 fev 2017. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>
4. Marimón JM, Villar M, García-Arenzana JM, Caba ID La, Pérez-Trallero E. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leucocidin genes in northern Spain. *J Infect* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jan 17];64(1):47–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080089>
5. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing , Stress Responses , Metabolic Adaptation , and Regulation of Virulence Gene Expression. 2016;(June):299–316.
6. Wehrhahn MC, Robinson JO, Pascoe EM, Coombs GW, Pearson JC, Brien FGO, et al. Illness Severity in Community-Onset Invasive *Staphylococcus aureus* Infection and the Presence of Virulence Genes. 2012;205.
7. Silva, ECBF, Samico, TM, Cardoso RR, Rabelo MA, Bezerra-Neto AM, Melo FL, Lopes ACS AI et al. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. *Rev Esc Enferm USP*. 2012;46:132–7.
8. Edwards a M, Massey RC, Clarke SR. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Jan 17];27(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230461>
9. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 1996 Jan [cited 2014 Jan 20];17(1):47–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8789688>
10. Chen C-J, Hsu K-H, Lin T-Y, Hwang K-P, Chen P-Y, Huang Y-C. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2014 Jan 20];49(1):131–7. Available from: <http://jcm.asm.org/content/49/1/131.full>
11. Jarvis WR, Jarvis A a, Chinn RY. National prevalence of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus in inpatients at United States health care facilities, 2010. *Am J Infect Control* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 Jan 17];40(3):194–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22440670>
12. Lo W-T, Wang C-C, Lin W-J, Wang S-R, Teng C-S, Huang C-F, et al. Changes in the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004–2009. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Jan 17];5(12):e15791. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3012095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 13. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jan 17];2011:601905. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335658&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 14. Mulcahy ME, Mcloughlin RM. Host – Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends Microbiol* [Internet]. 2016;xx:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.012>
 15. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H a, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2005;5(12):751–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309905702954>
 16. Tong SYC, Chen LF, Fowler VG. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2014 Jan 17];34(2):185–200. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3272122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 17. Muenks CE, Hogan PG, Wang JW, Eisenstein KA, Burnham C-AD, Fritz SA. Diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing various niches of the human body. *J Infect* [Internet]. 2016;72(6):698–705. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445316300111>
 18. Bhatta DR, Cavaco LM, Nath G, Kumar K, Gaur A, Gokhale S, et al. Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):199. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1531-1>
 19. Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. Vol. 7, *PLoS Pathogens*. 2011.
 20. Shambat S, Nadig S, Prabhakara S, Bes M, Etienne J, Arakere G. Clonal complexes and virulence factors of *Staphylococcus aureus* from several cities in India. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jan 17];12(1):64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3438138&tool=pmcentrez>

&rendertype=abstract

21. Szczuka E, Urbańska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jan 17];58(1):47–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711180>
22. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LTT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jan 17];2012:417247. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3312323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Hewagama S, Spelman T, Woolley M, Mcleod J, Gordon D, Einsiedel L. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin (pvl) in Central Australia , 2006-2010. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1698-5>
24. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J* [Internet]. 2005 Dec [cited 2014 Jan 20];35 Suppl 2:S106-19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271055>
25. Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Aung TS, Mya S, San T, et al. Virulence factors and genetic characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates in Myanmar. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2011 Dec [cited 2014 Jan 17];17(4):525–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834665>
26. Johler S, Sihto H, Macori G, Stephan R. Sequence Variability in Staphylococcal Enterotoxin. 2016;1–10.
27. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, et al. Comparative Analysis of USA300 Virulence Determinants in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2011 Sep 15 [cited 2014 Jan 13];204(6):937–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3156927&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med* [Internet]. 2012 May [cited 2014 Jan 13];18(5):816–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3378817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. Vol. 119, *Journal of Clinical Investigation*. 2009. p. 2464–74.
30. Yao D, Yu F, Qin Z, Chen C, He S, Chen Z, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). 2010.

31. Tavares D a, Sá-Leão R, Miragaia M, de Lencastre H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. *BMC Infect Dis.* 2010;10:110.
32. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):178–82.
33. Bassetti M, Nicco E, Mikulska M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(SUPPL. 1).
34. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Vol. 94, *British Medical Bulletin.* 2010. p. 215–27.
35. Valle DL, Paclibare PAP, Cabrera EC, Rivera WL. Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary hospital in the Philippines [Internet]. Vol. 44, *Tropical Medicine and Health.* 2016. p. 1. Available from: <http://tropmedhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41182-016-0003-z>
36. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2014 Jan 9];8(6):747–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718557>
37. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)* analysis of MRSA. *Methods Mol Biol.* 2014;1085:131–48.
38. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2008;16(8):361–9.
39. Gosbell IB. Epidemiology, clinical features and management of infections due to community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (cMRSA). Vol. 35, *Internal Medicine Journal.* 2005.
40. Vuong C, Scientist [Principal, Yeh AJ, Irta P-B, Cheung GY, Scientist [Staff, et al. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* HHS Public Access. *Expert Opin Investig Drugs.* 2016;25(1):73–93.
41. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):99–139.
42. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4580–7.
43. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *NEnglJMed.*

- 2014;370(1533–4406 (Electronic)):1524–31.
44. Panesso D, Planet PJ, Diaz L, Hugonnet J, Tran TT, Narechania A, et al. Methicillin-Susceptible, Vancomycin-Resistant. 2015;21(10):1844–8.
 45. Yarlagadda V, Samaddar S, Haldar J. Intracellular activity of a membrane-active glycopeptide antibiotic against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2016;5:10–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716516000060>
 46. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* [Internet]. 2007;298(15):1763–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940231>
 47. Hayward A, Knott F, Petersen I, Livermore DM, Duckworth G, Islam A, et al. Increasing hospitalizations and general practice prescriptions for community-onset staphylococcal disease, England. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(5):720–6.
 48. Arshad S, Huang V, Hartman P, Perri MB, Moreno D, Zervos MJ. Ceftaroline fosamil monotherapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia (MRSAB): A comparative clinical outcomes study. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2017; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S120197121730022X>
 49. Tong SYC, McDonald MI, Holt DC, Currie BJ. Global implications of the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Indigenous populations. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Jun 15 [cited 2014 Jan 17];46(12):1871–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462175>
 50. Tong SYC, McDonald MI, Holt DC, Currie BJ. Global implications of the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Indigenous populations. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1871–8.
 51. Tatiana C, Barreto G. Mortality among Guarani Indians in Southeastern and Southern Brazil *Mortalidade indígena Guarani no Sul e Sudeste do Brasil*. 2011;222–36.
 52. McDonald M, Dougall A, Holt D, Huygens F, Oppedisano F, Giffard PM, et al. Use of a single-nucleotide polymorphism genotyping system to demonstrate the unique epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in remote aboriginal communities. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2014 Jan 17];44(10):3720–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1594797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 53. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2003;47(12).
 54. Groom A V, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, et al. American Indian Community. 2012;286(10).

55. Ofner-Agostini M, Simor AE, Mulvey M, Bryce E, Loeb M, McGeer A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian aboriginal people. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Feb;27(2):204–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465642>
56. GARCIA-GRAELLS C, ANTOINE J, LARSEN J, CATRY B, SKOV R, DENIS O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Epidemiol Infect.* 2012;140(3):383–9.
57. Camilo A, Filho M. Incidência da tuberculose em indígenas do município de São Gabriel da Cachoeira, AM Incidence of tuberculosis among indigenous people in the municipality of São Gabriel Cachoeira, AM. 2008;41(3):243–6.
58. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2001;5:200–14. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702001000400006&script=sci_arttext
59. Lu P, Chin L, Peng C, Chen T, Ma L, Siu LK, et al. Risk Factors and Molecular Analysis of Community Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage Risk Factors and Molecular Analysis of Community Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage. 2005;
60. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):354–60.
61. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. In: Dados de Infecção Hospital Geral 2015. Acesso em: 03 fev 2017. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/>
62. Nascimento-Carvalho CM, Lyra TG, Alves NN, Caldas RM, Barberino MG. Resistance to methicillin and other antimicrobials among community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains in a pediatric teaching hospital in Salvador, Northeast Brazil. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2008;14(2):129–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479198>
63. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1985–8.
64. Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, et al. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59(3):339–45.

65. Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, dos Santos LCG, de Souza Conceição M, et al. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2009;65(3):300–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.023>
66. Wassenberg MWM, Bootsma MCJ, Troelstra A, Kluytmans JAJW, Bonten MJM. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2010;17(2):316–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03260.x>
67. Jiménez JN, Vélez LA, Mediavilla JR, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, et al. Livestock- associated Methicillin- Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 Infection in Woman, Colombia. *Emerg Infectious Dis*. 2011;17(10):1970–1.
68. Chen F-J, Huang I-W, Wang C-H, Chen P-C, Wang H-Y, Lai J-F, et al. *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 May [cited 2014 Jan 17];50(5):1679–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Riffon E, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. 2001;39(7):2584–9.
70. Gharsa H, Ben Slama K, Lozano C, Gómez-Sanz E, Klibi N, Ben Sallem R, et al. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet Microbiol* [Internet]. 2012 May 4 [cited 2014 Jan 17];156(3–4):367–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22176760>
71. Fang H, Hedin G. Rapid Screening and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Clinical Samples by Selective-Broth and Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):2894–9.
72. Johnsson D, Mölling P, Strålin K, Söderquist B. Detection of Panton-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: Clinical and epidemiological aspects. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(10):884–9.
73. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 Nov 19 [cited 2014 Jan 20];51(12):4537–4537. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168021/>
74. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McCallister SK, Tenover FC. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States : Establishing a National Database. 2003;41(11):5113–20.

75. 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* [Internet]. 1991 Mar [cited 2014 Jan 20];29(3):426–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=269793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Cunha MDLRS, Calsolari R a O, Júnior JPA. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol* [Internet]. 2007;51(4):381–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446677>
77. 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* [Internet]. 2005 Jun [cited 2014 Jan 20];11(2):117–28. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992005000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=em
78. Koning S, Van Belkum A, Snijders S, Van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen J, et al. Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Panton-Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid pSK41. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3017–21.
79. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2014 Jan 17];75(2):408–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088896>
80. 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):1008–15.
81. e-BURST V3 Algorithm – *Staphylococcus aureus*. Acesso em: 03 fev 2017. Disponível em: <http://eburst.mlst.net/>
82. Coutinho LMS, Scazufca M, Menezes PR. Methods for estimating prevalence ratios in cross-sectional studies. *Rev Saude Publica*. 2008;42(6):992–8.
83. Barros AJD, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol* [Internet]. 2003;3:21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521200&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
84. Tong SYC, Varrone L, Chatfield MD, Beaman M, Giffard PM. SHORT REPORT Progressive increase in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Indigenous populations in northern Australia from 1993 to 2012. 2015;2:1519–23.

85. Shukla SK, Stemper ME, Ramaswamy S V, Conradt JM, Reich R, Graviss EA, et al. Molecular Characteristics of Nosocomial and Native American Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones from Rural Wisconsin. 2004;42(8):3752–7.
86. Park SY, Chung DR, Yoo JR, Baek JY, Kim SH, Ha YE, et al. Sequence type 72 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged as a predominant clone of nasal colonization in newly admitted patients. 2016;93:386–9.
87. Frank KM, Zhou T, Moreno-Vinasco L, Hollett B, Garcia JGN, Bubeck-Wardenburg J. Host response signature to *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin implicates pulmonary Th17 response. *Infect Immun* [Internet]. 2012 Sep [cited 2014 Jan 17];80(9):3161–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Coimbra Júnior CE, Santos R V., Tanus R. Estudos epidemiológicos entre grupos indígenas de Rondônia. I--Piodermite e portadores inaparentes de *Staphylococcus* sp. na boca e nariz entre os Suruí e Karitiana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985;27(1):13–9.
89. Ruimy R, Angebault CC, Lix Djossou F, Dupont C, Epelboin L, Jarraud S, et al. Are Host Genetics the Predominant Determinant of Persistent Nasal *Staphylococcus aureus* Carriage in Humans? *J Infect Dis*. 2010;202(6):924–34.
90. Pires FV, Da Cunha MDLRDS, Abraão LM, Martins PYF, Camargo CH, Fortaleza CMCB. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A population-based survey. *PLoS One*. 2014;9(3).
91. Vandendriessche S, Hallin M, Cattry B, Jans B, Deplano A, Nonhoff C, et al. Previous healthcare exposure is the main antecedent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on hospital admission in Belgium. 2012;2283–92.
92. Sader HS, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility patterns of community- and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from United States Hospitals: results from the AWARE Ceftaroline Surveillance Program (2012–2014). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;86(1):76–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.017>
93. Franchi EPLP. 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 (doutorado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Botucatu-SP.
94. Liu Y, Zhang J, Ji Y. PCR-based Approaches for the Detection of Clinical Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2016;45–56.
95. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Infect Dis* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2014 Jan

- 15];197(9):1226–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422434>
96. Davis MF, Iverson SA, Baron P, Vasse A, Silbergeld EK, Lautenbach E, et al. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. Vol. 12, *The Lancet Infectious Diseases*. 2012. p. 703–16.
 97. Alvarez-Uria G, Gandra S, Laxminarayan R. Poverty and prevalence of antimicrobial resistance in invasive isolates. *Int J Infect Dis*. 2016;52:59–61.
 98. Kocsis E, Lagler H, Pesti N, Stich K, Kristóf K, Nagy K, et al. Comparison of Austrian, Hungarian and Macedonian methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains in relation to prevalence of cytotoxin genes. *Microb Pathog* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Jan 17];46(6):328–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366626>
 99. Access O. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates Detektion verschiedener in die Biofilmbildung involvierter Gene von *Staphylococcus aureus*. 2016;11:1–5.
 100. Balaji K, Thenmozhi R, Pandian SK. Effect of subinhibitory concentrations of fluoroquinolones on biofilm production by clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Indian J Med Res*. 2013;137(5):963–71.
 101. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *staphylococcus aureus*. *Iran Biomed J*. 2016;20(3):175–81.
 102. Abraão LM. Detecção dos genes de virulência e identificação do perfil clonal de isolados de *Staphylococcus aureus* colonizantes de nasofaringe obtidos em estudo de base populacional. Botucatu, 2013. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Botucatu-SP.
 103. Pacheco RL, Lobo IRD, Oliveira IIMS, Farina IIEF, Santos ICR, Costa IISF, et al. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in a dermatology unit. 2011;66(12):2071–7.
 104. Boan P, Tan H, Pearson J, Coombs G, Heath CH, Robinson JO. Epidemiological , clinical , outcome and antibiotic susceptibility differences between PVL positive and PVL negative *Staphylococcus aureus* infections in Western Australia : a case control study. 2015;1–6.
 105. R.Z. K, A.A.I. F, H.M. H, E.M. A. Prevalence of exfoliative toxin A and B genes in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens [Internet]. Vol. 7, *Journal of Infection and Public Health*. 2014. p. 177–85. Available from: http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/716388/description/nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014316088
 106. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M. Regulatory Mechanism for Exfoliative Toxin Production in *Staphylococcus aureus* □.

- 2011;79(4):1660–70.
107. Munckhof WJ, Nimmo GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Stephens a J, Williams G, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2009 Feb;15(2):149–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154489>
 108. M Cristina G, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005;1(1):0055–61.
 109. Cockfield JD, Pathak S, Edgeworth JD, Lindsay JA. Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *J Med Microbiol*. 2007;56(5):614–9.
 110. Witzel C de L, Fortaleza CMCB, de Souza CSM, Riboli DFM, da Cunha M de LR de S, Castelo Branco Fortaleza C, et al. Nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* among imprisoned males from Brazil without exposure to healthcare: risk factors and molecular characterization. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2014;13(1):25. Available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/13/1/25>
 111. Schuenck RP, Nouér SA, de Oliveira Winter C, Cavalcante FS, Scotti TD, Ferreira ALP, et al. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(4):434–41.
 112. Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2014 Jan 13];301(6):500–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570348>
 113. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnera A, Kevric I, et al. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jan 17];7(1):e30487. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3264586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 114. Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13(1):252. Available from: <http://europepmc.org/articles/PMC3679727/?report=abstract>
 115. Al-Rawahi GN, Reynolds S, Porter SD, Forrester L, Kishi L, Chong T, et al. Community-associated CMRSA-10 (USA-300) is the predominant strain among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing skin and soft tissue infections in patients presenting to the emergency department of a Canadian tertiary

- care hospital. *J Emerg Med* [Internet]. 2010;38(1):6–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325716>
116. Rabello RF, Moreira BM, Lopes RMM, Teixeira LM, Riley LW, Castro ACD. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol* [Internet]. 2007;56(11):1505–11. Available from: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47357-0>
117. Ouedraogo AS, Dunyach-Remy C, Kissou A, Sanou S, Poda A, Kyelem CG, et al. High nasal carriage rate of *Staphylococcus aureus* containing panton-valentine leukocidin- and EDIN-encoding genes in community and hospital settings in Burkina Faso. *Front Microbiol*. 2016;7(SEP):1–7.
118. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* [Internet]. 2007;445(7130):915–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287725>

12. Anexos

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) a ser assinado em duas vias: uma para o sujeito e outra para o pesquisador.

I – TCLE para adultos

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa chamado “Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* em populações indígenas do Norte e Sudeste do Brasil: Resistência Antimicrobiana, Virulência, Fatores de Risco e Epidemiologia Molecular”. Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessária.

Texto:

Várias pessoas carregam no nariz uma bactéria chamada “estafilococo”. Normalmente essa bactéria não causa nenhum mal, mas algumas têm um “estafilococo” diferente, que é resistente a vários antibióticos. Essas pessoas têm maior risco de adquirir infecções de pele, pneumonias e outras. O objetivo da nossa pesquisa é identificar as pessoas que carregam o “estafilococo”, principalmente em sua forma resistente. Para isso, precisamos colher secreção das suas narinas e realizar exames. A coleta da secreção se faz introduzindo uma espécie de “cotonete” em cada narina. Isso é feito de forma suave e não causa dor, podendo causar apenas um desconforto.

Na secreção colhida, serão feitos exames para identificar se o “estafilococo” está presente e se ele é da forma resistente. Também serão realizados exames para identificar a tendência dessa bactéria em causar doença. Você ficará sabendo do resultado através dos pesquisadores, que entrarão em contato com o cacique ou chefe da aldeia. Caso você tenha o “estafilococo” resistente ou venha apresentando várias infecções de pele, será fornecida uma “pomada” nasal ou um sabão líquido com antisséptico para eliminação do “estafilococo”, se assim você desejar. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, e sua distribuição em meio à população indígena, possibilitando medidas de prevenção e tratamento de infecções.

Precisaremos também que você responda a um questionário com informações pessoais que será aplicado pelo pesquisador. Você levará cerca de 10 minutos para responder esse questionário. É importante você saber que em nenhum momento será divulgado seu nome ou qualquer informação que permita sua identificação. Além disso, você poderá retirar sua participação da pesquisa quando quiser, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores, e, se não se sentir atendido, com o Chefe do Departamento de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu. Quaisquer

outras dúvidas podem ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Fone: (14)3880-1608 ou 3880-1609).

Este documento deve ser assinado em duas vias, uma das quais ficará com você e a outra com os pesquisadores do projeto.

Declaro que li o texto acima e concordo em participar do projeto de pesquisa.

Ass.: _____ Nome: _____

Assinatura dos Pesquisadores:

Lígia Maria Abraão e/ou: _____

Rodrigo Medeiros de Souza: _____

II – TCLE para menores de 18 anos.

Estamos convidando seu[sua] filho[a] (ou dependente legal) a participar do projeto de pesquisa chamado “Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* em populações indígenas do Norte e Sudeste do Brasil: Resistência Antimicrobiana, Virulência, Fatores de Risco E Epidemiologia Molecular” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessária.

Texto:

Várias pessoas carregam no nariz uma bactéria chamada “estafilococo”. Normalmente essa bactéria não causa nenhum mal, mas algumas têm um “estafilococo” diferente que é resistente a vários antibióticos. Essas pessoas têm maior risco de adquirir infecções de pele, pneumonias e outras. O objetivo da nossa pesquisa é identificar as pessoas que carregam o “estafilococo”, principalmente em sua forma resistente. Para isso, precisamos colher secreção das narinas do[a] seu[sua] filho[a] (ou dependente) e realizar exames. A coleta da secreção se faz introduzindo uma espécie de “cotonete” em cada narina. Isso é feito de forma suave e não causa dor, podendo causar apenas um desconforto.

Na secreção colhida, serão feitos exames para identificar se o “estafilococo” está presente e se ele é da forma resistente. Também serão realizados exames para identificar a tendência dessa bactéria de causar doença. Você ficará sabendo do resultado através dos pesquisadores, que passarão o resultado para o Cacique ou chefe da aldeia. Caso seu[sua] filho[a] (ou dependente) tenha o “estafilococo” resistente ou venha apresentando várias infecções de pele, será fornecida uma “pomada” nasal e um sabão líquido com antisséptico para eliminação do “estafilococo”, se assim você desejar. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, e sua

distribuição em meio à população indígena, possibilitando medidas de prevenção e tratamento de infecções.

Precisaremos também que você responda a um questionário de informações sobre seu[sua] filho[a] ou dependente, que será aplicado pelo pesquisador. Você levará cerca de 10 minutos para responder o questionário. É importante você saber que em nenhum momento será divulgado seu nome ou de seu filho (ou dependente), e nem qualquer informação que permita sua identificação. Além disso, você poderá retirar a participação do[a] seu[sua] filho[a] (ou dependente) da pesquisa quando quiser, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores, e, se não se sentir atendido, com o Chefe do Departamento de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu. Quaisquer outras dúvidas podem ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Fone: (14)3880-1608 ou 3880-1609).

Este documento deve ser assinado em duas vias, uma das quais ficará com você e a outra com os pesquisadores do projeto.

Declaro que li e estou de acordo com a participação do meu filho [da minha filha] (e/ou dependente) no projeto de pesquisa.

Ass.: _____ Nome: _____

Assinatura do[a] menor (se tiver 12 anos ou mais):

Declaro que li o texto acima e concordo em participar do projeto de pesquisa.

Ass.: _____ Nome: _____

Assinatura dos Pesquisadores – Lígia Maria Abraão e/ou: _____

Rodrigo Medeiros de Souza: _____

Anexo 2 – Questionário a ser aplicado aos sujeitos da pesquisa (indígenas) no momento da coleta dos swabs.

Dados gerais:

Nome: _____ Data Nascimento: __/__/__ Idade: ____

Gênero: __ Profissão: _____ *Etnia*: _____ Escolaridade: _____

Renda familiar aproximada: _____ Data da entrevista: __/__/__

Se estudante (inclusive universitário):

Escola: _____ Turno: _____ Pública? () S () N

Se trabalha:

Local de trabalho: _____

Cargo ou Função: _____ Regime (h/semana): _____ Turno: _____

Tipo de Habitação:

() alvenaria () Taipa () madeira/palha () outros. Especificar: _____

Piso: () cimento () terra batida

Saneamento básico: () sim () não

Proximidade a serviços de atendimento a saúde: () sim () não. Distância em km: _____

Número de indivíduos que residem na casa? _____

Destino do lixo: _____

Práticas poligâmicas? () sim () não. Quantas (os) esposas (os)? _____

Esportes:

Pratica esportes? () S () N Qual(is)?: _____

Com que frequência?: _____

Uso de adornos:

() Brincos. Há quanto tempo?: _____

() Piercings. Local: _____. Há quanto tempo?: _____

() Tatuagem. Local: _____. Há quanto tempo?: _____

() Outros: _____. Há quanto tempo?: _____

Tem alguma dessas doenças:

() Doença cardíaca. Qual? _____.

() Doença pulmonar. Qual? _____.

() Doença renal. Qual? _____.

() Doença hepática. Qual? _____.

() Doença neurológica. Qual? _____.

() Diabetes mellitus. Usa insulina? () S () N.

() Neoplasia. Qual? _____.

() Aids.

() Úlceras crônicas. Onde? _____.

() Outra(s) doença(s) crônica(s): _____.

No último ano, apresentou:

- () Infecções de pele. Há quanto tempo? _____
- () Pneumonia. Há quanto tempo? _____
- () Outra infecção. Qual? _____. Há quanto tempo? _____

Uso de medicação no último ano:

- () Antibiótico(s). Qual(is)? _____. Quando? _____
- () Outra(s) medicação(ões). Qual(is)?: _____
- () Uso de práticas adicionais de cura. Qual(is)? _____
 _____. Quando? _____

Internação e outros procedimentos no último ano:

- () Internação. () S () N. Quando? _____
- () Cirurgia. Qual? _____. Quando? _____
- () Hemodiálise. Desde quando? _____
- () Outro procedimento. Qual? _____. Quando? _____
- () Consulta ambulatorial. Quando? _____
- Por que? _____

Álcool e outras substâncias:

- () Etilismo: () atual () passado.
 Desde Quando? _____ Bebida, doses/semana: _____
- () Tabagismo. () atual () passado.
 Desde quando? _____ Cigarros/dia: _____
- () Droga(s) inalatória(s). Qual(is)?: _____
- () Droga(s) injetável(s). Qual(is)?: _____

Instituições fechadas que frequentou no último ano:

- () Creche. Qual? _____
- () Serviço militar
- () Cadeia ou Presídio. Onde? _____
- () Casa de repouso. Qual? _____
- () Outra. Qual? _____

Peculiaridades culturais

Local destinado à higienização diária: () banheiro convencional () Rio de água corrente.

Frequência dos banhos: () 1x/dia () 2x/dia () 3x/dia () 4x ou mais

Uso de substância para pigmentação da pele. () sim () não. Especificar: _____

Alimentação predominante: _____

Outras observações do sujeito: _____

Anexo 3 – Instrumento observacional a ser utilizado para coleta de dados em nativos que apresentem dialeto próprio

Data da observação: __/__/__

Aldeia observada: _____ Etnia: _____ Língua:

Gênero dominante: () M () F Número aproximado de adultos e

crianças: _____

Tipo de Habitação:

() alvenaria () Taipa () madeira/palha () outros. Especificar: _____

Piso: () cimento () terra batida

Saneamento básico: () sim () não

Número de indivíduos que residem na casa? _____

Condições de higiene

Frequência dos banhos: () 1x/dia () 2x/dia () 3x/dia () 4x ou mais. Local:

Fonte de abastecimento de água:

Despejo do lixo e dejetos:

Atividades/costumes predominantes

Homem:

Mulheres e crianças:

Rituais realizados.

Descrever _____

Tipo de substância utilizada para pigmentação da pele:

Uso de adornos. Quais tipos: _____

Tipo de alimentação: _____

Origem dos alimentos: _____

Uso de práticas/rituais de cura: _____

Emprego de plantas medicinais: _____

Análise física

Presença de indivíduos com lesões, abrasões de pele:

Aparência nutricional dos sujeitos:

Indivíduos aparentemente adoecidos:

Condições ambientais:

Distância de centro urbano:

Acesso à assistência em saúde: _____