

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Taíse Marongio Cotrim de Moraes

**Avaliação dos fatores de virulência
de cepas de *Staphylococcus aureus*
isoladas de pacientes submetidos à
diálise peritoneal e correlação com a
evolução clínica dos episódios de
peritonite**

Orientadora: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Pasqual Barretti

Botucatu - 2008

Taíse Marongio Cotrim de Moraes

**Avaliação dos fatores de virulência de cepas
de *Staphylococcus aureus* isoladas de
pacientes submetidos à diálise peritoneal e
correlação com a evolução clínica dos
episódios de peritonite**

Monografia de conclusão de curso e artigo/relatório de Iniciação Científica (FAPESP) realizado no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências, UNESP, como exigência parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica

Orientador (a): Prof^a Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador(a): Prof. Dr. Pasqual Barretti

**Botucatu
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Moraes, Taíse Marongio Cotrim de.

Avaliação dos fatores de virulência de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes submetidos à diálise peritoneal e correlação com a evolução clínica dos episódios de peritonite / Taíse Morongio Cotrim de Moraes. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Pasqual Barretti

1. Microbiologia 2. *Staphylococcus aureus* 3. Peritonite

Palavras-chave: Fatores de virulência; Gene *mecA* ; Peritonite; Resistência bacteriana; *Staphylococcus aureus*

Dedicatória

Dedico não só esse trabalho como também todo meu caminho durante esses quatro anos à minha mãe Leila, meu pai Nelson (in memoriam) e meu irmão Tales porque, além de não pouparem esforços para me proporcionar a melhor educação, sempre estiveram ao meu lado me apoiando nas escolhas, incentivando todos os momentos e compartilhando as conquistas e alegrias.

Dedico também a toda minha família (tias, tios, primos, primas...), meu grande suporte e agradeço todo amor e carinho.

Dedico ainda ao Daniel , obrigado pelo apoio paciência e pelo seu carinho e amizade durante esse anos da minha vida.

Por fim, dedico a todos que passaram por minha vida e marcaram presença, bem como aqueles que ainda nela estão, de alguma forma, contribuindo para meu crescimento como ser humano.

Agradeço a Deus por ter vocês comigo!

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha pela oportunidade, paciência e confiança creditadas a mim durante meus primeiros passos científicos e pelos ensinamentos tanto na pesquisa como na postura diante as situações da vida.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Pasqual Barretti também pela paciência, pelas experiências compartilhadas e por acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas de laboratório, pela convivência diária, por compartilhar seus conhecimentos e experiências (Valéria, Jackson, Mariana, Eliane, Eliane Patrícia, Patrícia, Nathalie, Adriano, Deise, Letícia, Adilson, Marcus e André).

Às minhas colegas de iniciação científica e de classe, Aline e Patrícia, pela amizade, pelas risadas, pela ajuda durante os experimentos e pela companhia durante esse ano (principalmente durante nossa viagem).

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela ajuda sem medidas com materiais, vidrarias e equipamentos; pelo sorriso no rosto e pela enorme compreensão e paciência (Pedro, Isaltino, Ademival, Sônia, Nice, Luís, Lula e Janete).

Aos pacientes atendidos na Unidade de Diálise da Faculdade de Medicina de Botucatu por servirem de matéria-prima desse estudo.

As amigas e companheiras de casa Priscila e Heloísa e ao colega e companheiro de casa Eduardo, pela convivência diária, compreensão e amizade.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente estiveram envolvidos no desenvolvimento desse trabalho durante esse ano.

... a minha gratidão e consideração sinceras!

“Se alguma coisa se te opõe e te fere, deixa crescer. É que estás a ganhar raízes e a mudar. Abençoado ferimento que te faz parir de ti próprio.”

Antonie Saint-Exupéry

**Avaliação dos fatores de virulência de cepas de
Staphylococcus aureus isoladas de pacientes submetidos à
diálise peritoneal e correlação com a evolução clínica dos
episódios de peritonite**

Taíse Marongio C. de Moraes ¹; Pasqual Barretti ²; Maria de Lourdes
Ribeiro de Souza da Cunha ³

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade
Estadual Paulista – Campus Botucatu - tetmcm@yahoo.com.br

2. Professor Adjunto, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu – pbarretti@uol.com.br -
+551438116005

3. Professor Assistente Doutor, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto
de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu -
cunhamlr@ibb.unesp.br - +55 01438116240

A diálise peritoneal (DP) é uma terapia de substituição renal utilizada em pacientes renais crônicos. A peritonite é uma das suas principais complicações; sendo o *Staphylococcus aureus* causador de episódios mais graves e recorrentes. Os fatores de virulência desta bactéria são responsáveis por essa alta patogenicidade. Esse estudo objetivou avaliar esses fatores e a presença do gene *mecA* em amostras de *S.aureus* obtidas de episódios de peritonites de pacientes tratados com DP. Foram estudadas 73 amostras de peritonites ocorridas entre janeiro de 1996 e setembro de 2008. O estudo dos fatores de patogenicidade consistiu na detecção da produção de biofilme, de enzimas hemolisinas α e β , lipase, lecitinase e nucleases; e das enterotoxinas A, B, C, D e da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Ainda foi verificado o perfil de sensibilidade dos isolados à oxacilina pelo *Etest*® e detecção do gene *mecA* por PCR. Dentre todos os resultados, a produção de toxina B e a resistência à oxacilina foram os dois fatores que influenciaram a evolução dos casos de nova infecção. Quanto aos casos recorrentes, características dos pacientes como idade, raça e presença de diabetes foram mais determinantes para a não resolução dos surtos de peritonite.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; fatores de virulência; resistência à oxacilina; diálise peritoneal; peritonite

Fonte Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo (Fapesp)

1.INTRODUÇÃO:

A diálise peritoneal (DP) é um dos métodos utilizados para depuração sangüínea em pacientes portadores de alguma patologia renal em seu estágio final.

A primeira experiência usando a técnica de DP como tratamento da insuficiência renal foi realizada por Ganter [1] em 1923, utilizando solução salina na cavidade peritoneal de um paciente com insuficiência renal aguda. Porém, somente em 1976 [2], a técnica foi aprimorada e iniciou-se o uso clínico da chamada diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD). Após várias inovações na técnica durante os anos seguintes, como a substituição dos frascos de vidro que armazenavam a solução dialítica por bolsas plásticas [3]; a incidência de peritonites reduziram marcadamente.

Apesar do grande avanço na técnica de CAPD, a peritonite permanece como umas das principais complicações e é responsável pela falência desse método de substituição da função renal [4]; sendo também a causa mais marcante de internações dentre os pacientes da DP (representando cerca de 43%) [5]. Além disso, a peritonite é a causa de grande parte das desistências ocorridas durante o tratamento e pelas transferências de pacientes para a terapia com hemodiálise[6].

Dentre todos os microrganismos causadores da peritonite, o *Staphylococcus aureus*, dentre as bactérias gram-positivas, é causador de peritonites com curso mais complicado e com maior número de recorrências [7,8,9].

Staphylococcus aureus é uma bactéria pertencente à microbiota normal da pele. É um importante patógeno que atua como agente em várias infecções localizadas e sistêmicas e principalmente é conhecido como causador das síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico [10].

Possui vários fatores de virulência como enzimas, toxinas e o biofilme que são responsáveis por dificultar que o sistema imune reconheça a bactéria e construa uma resposta imune que a neutralize. As enzimas como catalase, desoxirribonuclease

termolábil (DNase) e a termoestável (TNase), hialuronidase, proteases, lipase, lecitinase e estafiloquinase promovem a hidrólise de diferentes proteínas e de outras moléculas podendo assim gerar nutrientes utilizáveis pelo *Staphylococcus aureus* e ao mesmo tempo facilitar a sua disseminação pelos tecidos [10]. Outra classe de enzimas estafilocócicas são as hemolisinas ou citotoxinas que tem a capacidade de formar poros na membrana celular dos leucócitos, promovendo a saída do conteúdo da célula culminando com a morte celular.

Esse patógeno pode ainda causar intoxicações que são provocadas pela ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado por ele. Essas toxinas são termoestáveis e são **superantígenos** sendo conhecidas como **enterotoxinas** compondo onze tipos imunologicamente distintas: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, TSST-1, G, H e I, e com base nas diferenças sorológicas a enterotoxina C é subdividida em EEC₁, EEC₂ e EEC₃ [11]. Os **superantígenos** são moléculas produzidas por bactérias que são capazes de se ligar inespecificamente ao MHC na célula apresentadora de antígenos e ao TCR (cadeia β) dos linfócitos T, promovendo a ativação de células T e maciça liberação de citocinas por macrófagos causando os sintomas de choque [11].

A **síndrome do choque tóxico**, outro tipo de intoxicação causada pelo *S. aureus*, é causada pela **toxina TSST-1** [11]. Caracteriza-se por dois padrões: primeiro a infecção que aparece em mulheres que fazem uso de tampões em período menstrual; e o segundo a infecção não relacionada ao período menstrual, em pacientes com infecções de pele, ossos e pulmões¹⁴.

A razão pela qual a peritonite causada por *S. aureus* tem curso complicado e alta taxa de recidiva sugere-se que se deva aos fatores de virulência desse patógeno como produção de biofilme no cateter peritoneal [12]. A função do biofilme é proteger as

bactérias que colonizam um cateter do ambiente com agentes antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro [13].

Essa espécie de bactéria ganhou maior atenção na década de 60 devido ao surgimento de cepas multi-resistentes a antibióticos como as MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) [14]. Um dos mecanismos de resistência à meticilina (ou oxacilina que é uma droga congênere da meticilina) desenvolvido pelo *S. aureus* está relacionado com a produção das **proteínas de ligação à penicilina**, as PBPs. As cepas MRSA expressam uma nova PBP, a PBP2a ou PBP2', adquirida de outras espécies de estafilococos e codificada pelo gene ***mecA***. Esta PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina e à oxacilina, mas praticamente a todos os antibióticos β -lactâmicos [15].

A importância dos estudos atualmente realizados é identificar dentre várias amostras hospitalares pertencentes a pacientes, quais são as multi-resistentes e quais não são, para assim fazer-se um controle epidemiológico e aplicar um tratamento com antibióticos adequados.

Apesar da DP ser técnica muito aplicada nos centros de tratamento de doenças renais em todo o mundo, a peritonite e seus vários agentes patogênicos principalmente o *S. aureus*, são poucos estudados. É preciso aprofundar os conhecimentos nessa área para poder minimizar as taxas de falha desse processo e o número de pacientes que são transferidos para a hemodiálise, bem como buscar novos métodos para prevenir e tratar esse tipo de inflamação.

Diante disso, esse trabalho objetivou estudar os episódios de peritonites ocorridos em pacientes tratados com DP atendidos na Unidade de Diálise da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, dando ênfase ao estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados a partir desses episódios, detectar por métodos de

biologia molecular (PCR) dentre todas as amostras quais contêm o gene *mecA*; além de estabelecer associações entre as características microbiológicas e a evolução clínica dos episódios.

2.RESULTADOS:

2.1. AMOSTRAGEM E IDENTIFICAÇÃO:

Foram trabalhadas amostras de *S.aureus* identificadas conforme critérios de propostos por Koneman *et al.* [16] e bacterioscopia pelo Gram; de 73 episódios de peritonite ocorridas em 40 pacientes insuficientes crônicos tratados por diálise peritoneal na Unidade de Diálise da Faculdade de Medicina de Botucatu durante o período de janeiro de 1996 a setembro de 2008.

2.2. FATORES DE PATOGENICIDADE:

2.2.1. Produção de biofilme:

Entre as 73 amostras coletadas, 65 (87,9%) produziam biofilme que foi detectado pela presença do corante impregnado na parede do tubo de borossilicato.

2.2.2. Produção enzimática:

2.2.2.1. Produção de hemolisinas:

Dentre as 73 amostras analisadas, 44 (60,3%) foram produtoras de pelo menos um tipo de hemolisina ou, também chamada citotoxina, e 29 (39,7%) delas não produziu nenhuma hemolisina. Trinta e quatro (45,9%) produziam a hemolisina α e 29 (39,2%) produziam a hemolisina β .

2.2.2.2. Produção de lipase e lecitinase:

Quanto a produção de duas enzimas, 62 (83,8%) foram positivas para a produção de lipase (Figura 3); e 67 (90,5%) foram positivas para produção de lecitinase.

Apenas três (4,10%) amostras não produziam nenhuma dessas enzimas e 60 (82,2%) produziam concomitantemente as duas enzimas.

2.2.2.3. Produção de nucleases:

Dentre as amostras, 68 (93,1%) foram produtoras da nuclease termolábil (DNAse) e 66 (90,4%) foram produtoras da nuclease termoestável (TNAse) (Figura 6). Sessenta e quatro (87,7%) amostras produziam ambas nucleases e apenas duas (2,7%) não produziam nenhuma delas.

2.2.3. Perfil toxigênico:

Foi analisada a produção de enterotoxinas (A, B, C) e Toxina 1 do Choque Tóxico (TSST-1).

2.2.3.1. Produção de Toxinas:

Através do método de saco de diálise, obteve-se os sobrenadantes de cada amostra contendo as nucleases e as toxinas.

2.2.3.2. Detecção de toxinas:

Do total de amostras estudadas, 42 (60%) delas produziam pelo menos um tipo de toxina; 28 (38,4%) não produziam nenhum tipo e apenas uma (1,37%) produzia os quatro tipos de toxinas. A produção de toxinas foi feita por aglutinação em látex (RPLA), observando-se a formação de uma rede para positividade e de um botão, para negatividade.

A toxina, mais produzida pelas amostras de *S.aureus*, foi a enterotoxina B, presente em 22 (30,14%) delas; e a menos produzida foi a enterotoxina A, presente em apenas nove (12,33%) das amostras. Quanto a toxina TSST-1, esta foi positiva em 21 (38,77%) das amostras enquanto a enterotoxina C foi positiva em 13 (17,8%) delas **(Figura1)**.

2.3. Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos:

Dentre os 73 casos de peritonite estudados, 61 (82,2%) deles tiveram como agente etiológico uma linhagem de *S.aureus* sensível ao antimicrobiano oxacilina. Os demais episódios, doze (17,8%) deles, foram causados por cepas oxacilino-resistentes.

2.4. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina em *S.aureus*:

Após a extração de DNA das amostras, através da técnica de PCR foi feita a amplificação do gene *mecA* (533 pares de base) e em seguida, através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, verificou-se a presença do gene em nove (12,3%) amostras estudadas.

2.5. DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS:

2.5.1 Características do tipo de episódio:

Foram coletados dados nos prontuários médicos dos pacientes que tiveram peritonites. Dos 73 episódios ocorridos, 20 (27,4%) deles foram novas infecções e 53 (72,6%) foram surtos recidivantes ou repetidos.

A distribuição dos fatores microbiológicos, os relacionados ao estado do paciente e os sintomas clínicos em relação a evolução (cura e não-cura) dos casos totais e em relação aos casos novos está expresso nas **tabelas 1 e 2**.

2.5.2. Condições prévias dos pacientes ao primeiro episódio:

A classificação da **faixa etária** dos pacientes foi feita em dois grupos: menores ou igual a 60 anos e maiores que 60 anos.

Dentre os 73 casos de peritonites, 52 (71,3%) deles ocorreram em pacientes do grupo de menores ou igual a 60 anos, enquanto que 21 (28,7%) dos casos ocorreram em pacientes com mais de 60 anos.

Quanto ao **sexo**, 47 (64,4%) dos episódios ocorreram em pacientes do sexo feminino e 26 (35,6%) foram em pacientes do sexo masculino.

Em relação à **cor da pele** dos pacientes, 53 (72,6%) dos casos foram em pacientes de cor branca e 20 (27,4%) em pacientes de pele não branca.

Trinta e seis (49,3%) dos surtos de peritonite ocorreram em pacientes diabéticos e 37 (50,7%) em pacientes que não tinham *diabetes mellitus*.

Entre os 73 episódios, 46 (63,1%) deles ocorreram em pacientes tratados com vancomicina e 27(36,9%) ocorreram em pacientes não tratados com essa droga.

2.5.3. Apresentação Clínica:

Os dados clínicos relacionados a cada episódio de peritonite foram registrados nos prontuários médicos e a partir disso foram coletados para análise nesse estudo.

A coleta do líquido dialítico foi realizada e em seguida a turvação foi verificada antes que se processasse a amostra para análise microbiológica.

A **presença de líquido peritoneal turvo** foi observada em 70 (95,9%) dos casos de peritonite.

O relato de **dor abdominal** foi observado em 49 (67,13%) dos episódios, enquanto que o de **náusea ou vômito** foi registrado em 28 (38,3%) deles.

Em relação aos desfechos dos surtos de peritonite, a **cura** foi resultado de 34 (46,6%) dos casos e o **óbito** em 8 (11%) deles. Tanto a **retirada de cateter peritoneal** quanto a **hospitalização** finalizaram a peritonite cada uma em 24 (32,9%) dos episódios.

2.6. Associações clínico-microbiológicas:

Avaliou-se através do modelo de regressão logística a influência os fatores microbiológicos, clínicos e relacionados ao paciente sobre a evolução e complicação dos 73 episódios de peritonite causados pela bactéria *S.aureus*. Considerou-se significante somente valores menores que 0,05. **(Tabela 3)**

2.6.1. Todos os Episódios (novas infecções, repetições e reincidências) :

2.6.1.1. Relevância dos dados clínico-microbiológicos sobre o desfecho cura:

Após relacionar todos os dados característicos dos pacientes, clínicos e microbiológicos com esse tipo de desfecho, a presença de diabetes e o tipo de episódio foram os únicos fatores que apresentaram significância sobre a resolução do episódio.

Surtos repetidos ou recidivas mostraram 88,85% menos chances de resultar em cura que os surtos caracterizados como nova infecção.

Além disso, pacientes diabéticos tiveram 67,6% menos chances de cura do que aqueles não diabéticos.

2.6.1.2.Relevância dos dados clínico-microbiológicos sobre a retirada de cateter:

Dentre todos os fatores analisados, somente o tipo de surto mostrou influência sobre a retirada de cateter, com três vezes mais chances em surtos repetidos ou recidivados do que em surtos novos.

2.6.1.3. Relevância dos dados clínico-microbiológicos sobre o desfecho óbito:

Apenas a faixa etária e a raça foram significantes sobre a ocorrência de óbitos decorrente da peritonite.

Pacientes com mais de 60 anos têm até 27 vezes maiores chances de morrerem devido a peritonite que os pacientes com idade inferior ou igual a 60 anos.

Quanto à raça, pacientes com cor da pele definida como não branca apresentaram 92,5% menos chances de morrerem devido a peritonite quando comparados a pacientes com cor da pele definida como branca. Isso indica um risco de morte devido a essa infecção em pacientes não caucasianos de 7,5% apenas.

2.6.1.4. Relevância dos dados clínico-microbiológicos sobre a ocorrência de hospitalização:

Somente o tipo de surto influenciou significativamente na ocorrência de hospitalização diante de um episódio de peritonite por *S.aureus*. Verificamos que os surtos recidivados ou repetidos têm quase quatro vezes mais chances de hospitalização que os casos de nova infecção.

2.6.2. Episódios caracterizados como Nova Infecção:

2.6.2.1. Influência dos fatores analisados sobre o desfecho cura em casos novos:

Dentre todos os dados clínicos, microbiológicos e relacionados aos pacientes estudados, a produção pela bactéria da enterotoxina B e a sensibilidade à oxacilina foram os únicos fatores significantes sobre a resolução da peritonite.

A produção da toxina B por amostras de *S.aureus* reduz em 80,9% a chance de cura de um surto de peritonite.

Quanto à sensibilidade à oxacilina, os episódios causados por linhagens de *S.aureus* sensíveis a essa droga têm 10 vezes mais chances de cura que aqueles causados por cepas resistentes a ela.

2.6.2.2. Influência dos fatores analisados sobre a retirada de cateter em casos novos:

Novamente somente os dois fatores, produção de toxina B pela bactéria e sensibilidade a oxacilina, tiveram significância sobre a retirada do cateter peritoneal.

Os episódios causados por amostras produtoras da enterotoxina B tiveram 5 vezes mais chances de culminarem com a retirada do cateter do que aqueles desencadeados por amostras não produtoras dessa toxina.

Já em relação à sensibilidade a oxacilina, casos que tinham como agente etiológico cepas que apresentavam esse perfil tiveram 94,4% menos chance de resultarem com a retirada do cateter.

2.6.2.3. Influência dos fatores analisados sobre o desfecho óbito em casos novos:

Dentre todos os dados microbiológicos analisados, nenhum se mostrou significativo sobre o resultado do episódio em óbito.

2.6.2.4. Influência dos fatores analisados sobre a ocorrência de hospitalização em casos novos:

O único dado microbiológico que mostrou significativo efeito sobre a hospitalização do paciente decorrente da peritonite foi a sensibilidade à oxacilina, indicando 91,3% menos chance de internação em comparação aos episódios provocados por linhagens oxacilina-resistentes.

2.6.2.5. Influência dos fatores analisados sobre o aparecimento de febre em casos novos:

Diante todos os dados estudados, apenas a presença de diabetes foi fator determinante sobre a ocorrência de febre. A análise estatística revelou que pacientes

diabéticos têm 90% menos chance de apresentarem febre durante o curso da peritonite que os pacientes não diabéticos.

3 .DISCUSSÃO:

S.aureus é a bactéria causadora de surtos de peritonites mais graves, com pior evolução e maiores taxas de recidivas e repetição dentre os microrganismos gram-positivos [7] .A patogenia de infecções causadas por esses *S. aureus* está associada com a produção de uma série de enzimas e toxinas; e a dificuldade na terapêutica dessas infecções devido à resistência apresentada por esses microrganismos aos antimicrobianos utilizados no tratamento. Entretanto, poucos dados disponíveis na literatura avaliam a influência desses fatores sobre a evolução dos episódios de peritonites causados por esses microrganismos [17,18]

Estudos que avaliem em conjunto a virulência de *S. aureus*, sensibilidade a antimicrobianos, detecção de genes de resistência a drogas e fatores preditivos do paciente ajudam a entender melhor a patogenia dessa infecção, bem como identificar os fatores associados ao prognóstico [6] . Além disso, eles podem contribuir com medidas de prevenção e tratamento [19].

Nesse estudo foram incluídas 73 amostras de *S.aureus* obtidas de 73 episódios de peritonite ocorridos no período de janeiro de 1996 a setembro de 2008, totalizando 12 anos de estudo, envolvendo 40 pacientes tratados por diálise peritoneal. Foi realizada a detecção dos fatores de virulência e gene *mecA*, que determina a resistência ao antimicrobiano oxacilina, em amostras de *S. aureus* causadoras de peritonite em pacientes insuficientes crônicos tratados por diálise peritoneal. Também foi feita a avaliação das características prévias dos pacientes antes do primeiro episódio de peritonite e os possíveis desfechos dos surtos.

Após analisar os fatores de patogenicidade, 65 dessas amostras foram positivas para a produção de biofilme, o que corresponde a 87% delas. Esses dados são concordantes com os encontrados por Dasgupta *et. al.*, em seu estudo realizado com culturas negativas de líquidos de CAPD, que verificaram 86% das amostras de *S.aureus* eram produtoras de limo [20].

Em relação a produção enzimática, mais de 40% das amostras estudadas eram produtoras da α -hemolisina; 39%, da β -hemolisina; 83% produziam lipase; 90% foram positivas para produção de lecitinase. Mais de 90% das amostras produziam a nuclease termolábil (DNAse) e a mesma porcentagem, produziam a nuclease termoestável (TNase). Um estudo realizado por Al-Wali *et. al.* com 79 amostras de *S.aureus* oriundas de CAPD observou que 80% dos isolados foram hemolíticos quando semeados em meio contendo sangue de coelho (α -hemólise) e mais de 50% deles apresentaram hemólise quando semeados em meio contendo sangue de carneiro (β -hemólise). Os dados sobre a produção de hemolisinas encontrados nesse estudo foram menores do que os obtidos por Al-Wali *et. al.* [21].

Ainda no trabalho realizado em 1998, 77% dos isolados deram reações positivas para lipase quando em contato com meio contendo Tween 80; e cerca de 80% deles produziam lecitinase quando semeadas em meio composto com por gema de ovo e telurito de potássio [21]. Esses valores foram próximos aos obtidos pelo presente estudo.

Em se tratando da produção das duas nucleases, nenhum dado foi encontrado na literatura sobre a detecção dessas enzimas em amostras de *S.aureus* obtidas de diálise peritoneal. Isso nos sugere que mais estudos sobre o papel dessas nucleases na patogenia da peritonite devam ser desenvolvidos.

Sobre o perfil toxigênico das amostras trabalhadas, 60% delas produziam pelo menos um tipo de enterotoxinas; e apenas uma amostra era produtora dos quatro tipos de toxinas detectadas. A distribuição da produção dessas toxinas foi a seguinte: 12% produziam a enterotoxina A, 30% produziam a enterotoxina B, 17% produziam a enterotoxina C e 28% produziam a toxina 1 do Choque Tóxico. Um estudo realizado anteriormente, verificou através da técnica de ELISA *sandwich* a produção de toxinas em amostras isoladas de CAPD [21]. Quarenta e dois dos 79 isolados (53%) foram positivos para produção de um único tipo dos cinco tipos de toxinas analisadas. Em torno de 12%, produziam a enterotoxina A; 80% produziam a enterotoxina B; e mais de 10%, produziam a enterotoxina C. A produção da toxina TSST-1 foi detectada por quase 40% dos isolados. Os dados por nós obtidos foram compatíveis com os relatados no estudo realizado em Sheffield, que indicou a maior produção nessa população de *S.aureus* das toxinas B e TSST-1 [21].

Em se tratando do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, destacou-se somente os resultados obtidos em relação à sensibilidade à oxacilina, pois classicamente esta é considerada como marcador de resistência aos antibióticos betalactâmicos, amplamente aplicados no tratamento de peritonites causadas por microrganismos Gram-positivos [19]. Através do método do *Etest*®, observamos 17,8% das amostras analisadas foram resistentes à oxacilina. Esse resultado é compatível com o encontrado por Szeto *et. al.* em estudo retrospectivo de dez anos com 152 pacientes tratados por DP realizado em 2007 na China, que observou 18,4% dos episódios causados por *S.aureus* resistentes à metilicina [8].

Quanto a presença do gene *mecA* que expressa resistência a droga oxacilina, detectou-se através da PCR o gene em 12% das amostras analisadas. Na literatura, outras publicações mostram, como em nosso estudo, taxas bem baixas de amostras

meticilina-resistentes na população tratada por DP. Kan *et.al.* em trabalho realizado na Austrália com 122 episódios de peritonite encontrou 10 casos causados por *S.aureus*, sendo que apenas dois deles foram causados por linhagens resistentes a meticilina (cerca de 1,7%). No entanto, o método utilizado para detecção de cepas MRSA não foi mencionado nesse estudo [38].

O fato de alguns pacientes da DP serem portadores nasais e epiteliais de linhagens de *S.aureus* resistentes á oxacilina contribui para que essas cepas sejam causadoras de episódios de peritonite nesses indivíduos. Lu *et.al.* em estudo realizado em Taiwan, relataram que dentre os 379 pacientes incluídos na pesquisa, 38 (10%) foram confirmados com carreadores nasais de *S.aureus*, sendo que 35(9%) eram linhagens sensíveis à meticilina e apenas três (percentual menor que 1%) eram resistentes [39]. Neste trabalho, verificou-se também através de técnicas de biologia molecular, que a linhagem bacteriana encontrada nas fossas nasais era a mesma isolada dos sítios da infecções. Além disso, 28% dos indivíduos dialisados considerados carreadores nasais de MRSA desenvolveram infecção por cepas de MRSA subsequente. Fatores de risco como a presença de doenças adjacentes, tratamento recente com antimicrobianos e recente admissão hospitalar foram significativamente relacionados à condição de carreadores de MRSA [39].

Os resultados relativos as condições prévias dos pacientes (faixa etária, raça, sexo) e condições comórbidas (como presença de *diabetes mellitus* e tratamento prévio com vancomicina), bem como a apresentação clínica dos episódios foram analisados em conjunto e também tomando-se separadamente casos de nova infecção e casos repetidos ou recidivas. Dos 73 episódios de peritonite, 53 (cerca de 72%) deles foram caracterizados como nova infecção e 20 (27%) deles como repetições ou recidivas. Esses dados são compatíveis aos encontrados por Szeto *et. al.* durante estudo de 245

episódios causados por *S.aureus*, sendo que 32% desses foram surtos recidivas ou repetidos [8]; e por West *et.al.* que relataram 85% de novas infecções e 14,5% de casos recorrentes em 55 episódios [9].

De maneira geral, a maioria dos casos ocorreram em pacientes com idade menor ou igual a 60 anos (71%), do sexo feminino (64%) e caucasianos (72%). Um pouco mais da metade dos episódios ocorreram em pacientes diabéticos (50,7%) e 63% deles em indivíduos que tinham sido tratados anteriormente com vancomicina. Alguns trabalhos anteriores relataram essas características como fatores de risco para a ocorrência de peritonite. Kotsanas *et. al.* em 2007, observaram que as taxas de peritonite em pacientes do sexo feminino foram quase duas vezes maiores que em pacientes do sexo masculino [9]. No entanto, outros autores como Fried *et.al.* , descreveram maiores riscos de morte por peritonite em pacientes não-diabéticos e idosos; que são dados contrários aos levantados nesse presente estudo [23].

Quanto à apresentação clínica, mais de 95% dos episódios estudados apresentaram líquido peritoneal turvo. Em torno de 67% dos pacientes incluídos no estudo relataram sentir dores abdominais durante o curso da infecção; e 38% deles apresentaram náuseas ou vômito. Além disso, a presença de febre foi registrada em 28% dos casos e de hipotensão em 17,8% deles. Na literatura, há publicações que mostram que peritonites causadas pelo agente *S.aureus* apresentam maior frequência desses sintomas que aquelas provocadas por outros microrganismos gram-positivos [17]. Isso se deve, provavelmente, a ação dos fatores de patogenicidade desse patógeno como toxinas com atividades pirogênicas e enzimas líticas sobre o sistema imune do hospedeiro [24].

Com relação aos desfechos observados nos surtos, a cura foi o resultado de 46% dos casos; a retirada de cateter foi necessária em 32,9% bem como a hospitalização

mesmo percentual de casos. Oito óbitos (11%) foram registrados dentre os 73 episódios. Os números obtidos nessa avaliação são coerentes com os apresentados por West et.al. e Krishnann et.al. que relataram taxas de remoção do cateter semelhantes e pior resolução dos casos que tinham o *S.aureus* como agente etiológico., respectivamente [21 e 6].

Analizando todos os episódios de peritonite (nova infecção e recidivas ou repetições), em relação à ocorrência de cura, a análise do modelo de regressão logística mostrou que os surtos recidivantes ou repetidos e a presença de diabetes foram fatores independentes associados com menor probabilidade de cura em um episódio de peritonite. Esses dois dados já haviam sido apontados anteriormente como causas de pior resolução dos surtos provocados pelo *S.aureus* [6]. Tranaeus *et.al.* em estudo realizado em 1989, encontraram o diabetes como fator de risco para não cura da infecção peritoneal (maiores taxas de mortalidade) [25].

Já em relação à retirada de cateter, surtos recidivados ou repetidos tiveram três vezes mais chances de necessidade de remoção do acesso peritoneal que os casos novos. Resultado semelhante foi observado anteriormente por Szeto *et. al.*. [8].

Quanto à ocorrência de óbito a faixa etária e a raça foram variáveis independentes associadas com o desfecho morte. Pacientes com idade maior ou igual a 60 anos tiveram vinte e sete maior chance de óbito enquanto; aqueles considerados não caucasianos tiveram risco de morte decorrente menor que os caucasianos, com redução de risco para apenas 7,5%. Ambas constatações foram feitas também por Fried *et.al.* e Han *et.al.*, em trabalhos que avaliaram vários fatores de risco de mortalidade em peritonites [23 e 26].

Quanto ao desfecho hospitalização analisado em todos os episódios, mais uma vez, o tipo de surto foi apontado como preditivo independente de risco, com quase quatro vezes mais chances de ocorrência que surtos novos. Tanto esse resultado quanto

os apresentados em relação à ocorrência de remoção do cateter, foram antes descritos por Bunke *et.al.* como causas de pior prognóstico das peritonites provocadas pelo *S.aureus* [17].

Por outro lado, quando analisados somente os casos classificados como nova infecção, os resultados mostrados pela análise multivariada diferiram em relação aos obtidos para o total de surtos. Quanto aos desfechos cura e remoção do acesso peritoneal, a produção da enterotoxina B e a sensibilidade à oxacilina foram fatores independentes preditivos da resolução da infecção. A produção da toxina B se associou a maior chance de retirada do cateter peritoneal e de não cura da peritonite. Essa constatação tem fundamento pois essa toxina além de ser um superantígeno como os demais tipos de toxinas estafilocócicas, possui ações semelhantes a toxina TSST-1 que é um potente estímulo a proliferação de linfócitos e liberação de citocinas como IL-10, IFN- γ e TNF- α . Lu *et.al.* em estudo com líquidos dialíticos e soro de pacientes de CAPD, detectaram altos níveis dessas citocinas nesses materiais. Isso pode explicar o papel dessa toxina nos episódios repetidos ou recidivados de peritonite [27].

Por sua vez os surtos provocados por linhagens de *S.aureus* sensíveis à oxacilina tiveram cerca de dez vezes mais chances de cura quando comparados aos episódios desencadeados por linhagens oxacilino-resistentes. Resultado semelhante foi verificado em 2004 por Kim *et.al.* que relataram maiores taxas de retirada de cateter em episódios causados por amostras de *Staphylococcus* sp. resistentes à oxacilina do que aqueles provocados por cepas sensíveis, embora não foi constatada, pelos métodos estatísticos por eles utilizados, diferença significativa entre os surtos provocados por MRSA e MSSA, somente os causados por estafilococos coagulase-negativa [28].

Em relação à hospitalização, novamente a sensibilidade a esse antimicrobiano foi encontrada o como indicativa de menores chances de internações. Estudos prévios já

citados, chegaram à mesma constatação diante da pior resolução apresentada pelos casos provocados por amostras estafilocócicas oxacilino-resistentes [28]. No entanto, quanto à ocorrência de óbito dentro dos casos novos, não houve associações significativas entre os fatores analisados e esse tipo de desfecho.

Quanto à apresentação de alguns sintomas e as características relacionadas à condição dos pacientes antes da peritonite, o único fator que se revelou significativo foi, nos casos de nova infecção, a associação entre a presença de diabetes e a menor chance de ocorrência de febre. Verificamos que pacientes diabéticos tiveram 90% menos chances de apresentarem febre durante o surto de peritonite quando comparados aos pacientes não-diabéticos. Até o momento não foi encontrada na literatura qualquer registro que tenha associado o sintoma febre à presença de diabetes. Nós acreditamos que o estado deprimido do sistema imune dos diabéticos, possa ser a causa para que a apresentação de febre entre esses pacientes seja menor, já que a elevação da temperatura corporal acima da fisiológica ocorre durante um processo infeccioso devido a liberação de citocinas e outros produtos pirogênicos como prostaglandinas por leucócitos.

Os dados do presente estudo confirmaram dados previamente publicados acerca da influência de fatores do hospedeiro e do agente etiológico sobre a evolução das peritonites por *S. aureus* em pacientes tratados por diálise peritoneal [6]. Os resultados obtidos, por outro lado, mostram o papel da toxina B, como fator de patogenicidade determinante de pior evolução dessas infecções, dado não anteriormente publicado na literatura. Como perspectiva futura, a detecção dessa toxina, poderia induzir o clínico a medidas terapêutica mais agressivas, ou mesmo a remoção precoce do cateter peritoneal, reduzindo potencialmente a morbidade dessas infecções peritoneais.

4. CONCLUSÕES:

Os resultados permitem concluir que dentre os fatores de patogenicidade do *S.aureus*, a toxina B e a resistência à oxacilina são importantes características desse patógeno na ocorrência e não resolução dos novos episódios de infecções em pacientes tratados com diálise peritoneal. Já nos casos definidos como recidivas ou repetições, características dos pacientes como idade, raça e presença de diabetes são fatores independentemente associados à pior evolução do episódio de peritonite.

Em resumo, pode-se afirmar que o principal fator que exerce influência sobre a gravidade do episódio de peritonite em casos novos é a virulência e perfil de sensibilidade do microrganismo causador do surto. Entretanto, quando se tratar de um caso reincidente ou repetido, o que merece maior atenção durante a terapêutica desse episódio é o estado geral do paciente que pode influenciar significativamente na não cura deste surto.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

5.1. DEFINIÇÕES:

Segundo a última versão das recomendações do *Ad Hoc Advisory Committee* da Sociedade Internacional de Diálise Peritoneal [29], a peritonite foi definida como a ocorrência de efluente peritoneal turvo associado com um ou mais desses sinais ou sintomas: dor abdominal, descompressão abdominal brusca dolorosa, náuseas, vômitos ou febre. A presença de um destes sinais, isoladamente, foi considerada peritonite se houver, concomitantemente, a contagem de glóbulos brancos maior que 100 células/ μ L e sendo no mínimo 50% de polimorfonucleares.

Também de acordo com normas internacionais, os episódios foram classificados em três grupos: nova infecção; recidiva; e repetição [29]. A denominação nova infecção

correspondeu ao primeiro episódio de peritonite do paciente ou episódio diagnosticado pelo 4 semanas, após o término do tratamento de um surto anterior. Recidiva é denominada como episódio de reaparecimento dos sinais e sintomas de peritonite, no decorrer de quatro semanas depois de cessada a terapia antimicrobiana, com crescimento, em cultura, do mesmo agente etiológico da peritonite identificado anteriormente ou com cultura negativa. Repetição foi definida como um episódio que ocorre em período maior que 4 semanas depois de completa a terapia do primeiro episódio com identificação do mesmo organismo causador do episódio anterior.

5.2.AMOSTRAGEM:

Foram estudados os dados microbiológicos e clínicos de 73 episódios de peritonite bacteriana, ocorridos em 40 pacientes portadores de IRC, tratados por diálise peritoneal, no período de início em janeiro de 1996 a setembro de 2008, com identificação em cultura de efluente peritoneal de *Staphylococcus aureus*.

5.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS:

5.3.1. Coleta para cultura e Identificação:

Foram assepticamente coletados 40 mL de efluente peritoneal da última bolsa trocada e semeados em frascos contendo meios para hemocultura. A seguir, os frascos foram imediatamente encaminhados para o laboratório, para processamento automático (BACTEC®).

Para a identificação do *S. aureus*, foram seguidos os critérios propostos por Koneman *et al.* [16], conforme esquema simplificado de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização de testes de coagulase, prova de catalase, caracterização de hemolisinas e também bacterioscopia morfo-tintorial com coloração de Gram das amostras que acusaram crescimento bacteriano positivo.

5.3.2. FATORES DE PATOGENICIDADE:

5.3.2.1. Estudo da produção de limo (biofilme):

A pesquisa da produção de limo foi efetuada pelo método de Christensen *et al.* [30] em que colônias isoladas de *S.aureus* em ágar sangue foram inoculadas em tubos de borossilicato contendo 2,0 mL de caldo Trypticase Soja e incubadas a 37°C por 48 h, sem agitação. Posteriormente, o conteúdo foi desprezado e alíquotas de 1,0 mL de solução aquosa a 0,4% de azul tripan foram adicionadas em cada tubo. Após suave agitação, para garantir a coloração do material aderido à superfície interna dos tubos, o corante foi desprezado. O resultado positivo foi indicado pela presença de uma camada de material corado aderido à parede interna dos tubos.

5.3.2.2. Estudo da produção enzimática:

Foram pesquisadas nas linhagens de *S.aureus* em estudo, a produção de hemolisinas, lipase, lecitinase, desoxirribonuclease (DNase) e termonuclease (TNase) conforme os seguintes métodos:

5.3.2.2.1. Determinação da produção de hemolisinas:

A determinação da produção de hemolisinas alfa (α) e beta (β), foi realizada em placas de Petri contendo “Blood Agar Base” adicionado de 5% de sangue de coelho e de 5% de sangue de carneiro, respectivamente²⁶. As linhagens semeadas individualmente em quadrantes, foram incubadas a 37°C por 24 horas objetivando-se a detecção da hemolisina α . Para a caracterização da hemolisina β , as placas foram mantidas a essa temperatura por 24 horas e depois colocadas na geladeira por mais 72 horas. O resultado positivo foi indicado pela formação de zonas de hemólise ao redor do crescimento bacteriano [16].

5.3.2.2.2. Determinação de lipase e de lecitinase:

A atividade lipolítica foi evidenciada em placas contendo "Blood Agar Base" enriquecido com 0,01% de $\text{CaCl}_2 : 2\text{H}_2\text{O}$ e 1% de Tween 80 . As linhagens foram inoculadas em quadrantes e, após incubação a 37°C por 18 horas e por mais 24 horas a temperatura ambiente, foram observadas quanto ao aparecimento de opacidade ao redor do crescimento, o que caracterizou o resultado positivo.

Por outro lado, a produção de lecitinase foi estudada em meio de Baird-Parker , adicionado de 5,0% de solução de gema de ovo e 1,0% de Telurito de Potássio (K_2TeO_3). O resultado positivo foi indicado pela formação de halo opaco ao redor do crescimento.

5.3.2.2.3. Determinação de DNase e TNase:

A DNase e TNase foram determinadas pela técnica da difusão metacromática em ágar azul de ortotoluidina-DNA (TDA), seguindo-se essencialmente o método de Lachica *et al.* [31].

Para a detecção de DNase, foram utilizados os sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de linhagens de *S.aureus* em caldo BHI previamente incubadas a 37°C por 24 horas e centrifugadas por 10 minutos a $8.000 \times g$ / 4°C. Os sobrenadantes foram, colocados em orifícios de 7 mm efetuados no ágar e incubados a 50°C por 4 horas. Na sequência relativa a produção de TNase, os sobrenadantes foram previamente aquecidos em banho-maria por 20 minutos e colocados nos orifícios. Para ambas as determinações, o resultado da atividade nucleásica foi expresso medindo-se, em milímetros, o diâmetro do halo róseo formado no meio de difusão. A interpretação dos resultados positivos foi realizada através da comparação dos halos obtidos com linhagem padrão de *S. aureus* (ATCC 25923), DNase e TNase positiva.

Os sobrenadantes obtidos a partir do método de cultura em saco de diálise de Donnelly *et al.* [32], conforme descrição abaixo, também foram testados quanto à DNase e TNase.

5.3.2.3. Determinação do perfil toxigênico:

O perfil toxigênico das linhagens foi analisado quanto a produção de enterotoxinas e Toxina 1 do Choque Tóxico (TSST-1).

5.3.2.3.1. Produção de toxinas:

Para a determinação do perfil toxigênico foi utilizada a técnica de produção de toxinas pelo método de saco de diálise de Donnelly *et al.* [32]. Com este objetivo, sacos de diálise foram previamente lavados em água destilada, amarrados em uma das extremidades, preenchidos com 50 mL de caldo BHI em concentração dupla e amarrados na outra extremidade. Os sacos assim preparados foram colocados em erlenmeyers de 250 mL para adotarem a forma de U no fundo do frasco. Os frascos foram autoclavados durante 15 min a 121°C e, posteriormente, volumes de 18 mL de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,4 em 0,9% de NaCl, foram inoculados com uma alçada das amostras de *S.aureus* previamente cultivadas em 5,0 mL de Caldo BHI a 37°C por 18 h. Estas misturas foram então transferidas para os erlenmeyers contendo os sacos, os quais foram incubados a 37°C por 24 h com agitação de 200 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 8.000 x g / 4°C, durante 10 min. Os sobrenadantes obtidos foram conservados a -20°C até o seu uso.

5.3.2.3.2. Detecção de enterotoxinas e de TSST-1:

A detecção desses produtos extracelulares foi realizada pelo método da aglutinação reversa passiva de látex (RPLA), segundo Shingaki *et al.* [33].

Para a realização dos testes foram utilizados os Kits SET-RPLA-T900 e TST-RPLA-TD940 (Oxoid Diagnostic Reagents®) para a detecção da enterotoxina A (EEA), enterotoxina B (EEB), enterotoxina C (EEC), enterotoxina D (EED), e da toxina do choque tóxico (TSST-1), respectivamente. Para essa finalidade, nos poços de microplaca com fundo em V(Elsevier®), foram colocados 25µL dos sobrenadantes obtidos conforme item 3.2.3.3.1 e tratados previamente com soro normal de coelho a 5% (v/v) ou Ig G purificada (5% v/v) obtida de coelho, para evitar a ocorrência de reações inespecíficas [34]. As amostras que apresentarem reações inespecíficas mesmo após esse procedimento, foram diluídas a 1: 10 com tampão fosfato 0,02M, pH 7,4, em 0,9 % de NaCl. A seguir, foram adicionados 25µL do látex sensibilizado com as anti-enterotoxinas e anti-TSST-1. As toxinas padrão foram utilizadas como controle positivo e as reações inespecíficas foram analisadas adicionando-se 25 µL do sobrenadante em 25 µl do látex controle. As placas assim preparadas foram cobertas com celofane estéril e os reagentes homogeneizados em micromixer por 3 min. Após incubação durante 20 a 24 h em temperatura ambiente, os resultados foram registrados com o auxílio de uma lupa e iluminação sobre fundo escuro. A reação positiva foi classificada em (+), (++), e (+++) de acordo com o padrão de aglutinação descrito pelo teste. A formação de um botão róseo foi interpretada como resultado negativo.

5.3.3. Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

A sensibilidade *in vitro* das cepas de *S.aureus* foram testadas para as seguintes drogas: penicilina G, oxacilina, cefalotina, ofloxacina, levofloxacina, netilmicina e vancomicina. Para tanto, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dessas drogas, através do *Etest*®. Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza tiras de plástico inertes e transparentes, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, na qual é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do

antimicrobiano a ser pesquisado. A concentração das diversas drogas no *Etest*® varia de 0,002 a 256 µg/ml. Os parâmetros técnicos envolvidos na realização do *Etest*® são: meio de cultura de Mueller-Hinton; inóculo com concentração final semelhante a turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland; incubação das placas em aerobiose a 41-40°C; e leitura pela verificação na escala da parte anterior da fita, do valor correspondente à intersecção da zona de elipse de inibição do crescimento bacteriano.

Os resultados do estudo das CIMs das diversas drogas foram expressos por meio da proporção de amostras sensíveis a cada droga, de acordo com definição do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2008 (**Tabela 4**) [35].

5.4. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina em *S. aureus* :

5.4.1. Extração do ácido nucléico:

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

A extração foi realizada com o Kit GFX (Amersham Pharmacia Biotech ®) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e em seguida foi adicionado 200 µl de água Milli Q aquecida a 70 °C que foi utilizada para a eluição. As amostras foram

centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a 4°C.

5.4.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR):

As reações de PCR (Reação da polimerase em cadeia) foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 1µM de cada primer (**Tabela 5**), 2,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e 150 ng de ácido nucléico (solução produto da extração). A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami *et al.* (1991) [36] que consistirão de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

5.4.3. Visualização dos produtos amplificados:

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com Brometo de Etídeo. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

5.5. DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS:

A partir dos prontuários médicos dos pacientes foram preenchidos protocolos (ficha anexa) com informações relativas a: (1) episódio de peritonite: data, apresentação clínica, tratamento, evolução (cura, remoção do cateter peritoneal, falência do método dialítico, hospitalização, óbito); (2) condições comórbidas (*diabetes mellitus*, tratamento prévio com antimicrobianos, outras doenças associadas); (3) dados demográficos: idade

(maior ou menor que 60 anos), gênero (masculino ou feminino), raça (branca ou não branca).

5.6. ASSOCIAÇÕES CLÍNICO-MICROBIOLÓGICAS :

5.6.1. Influência das características microbiológicas dos estafilococos na evolução das peritonites:

As características microbiológicas (identificação, presença ou ausência dos vários fatores de patogenicidade) da espécie *Staphylococcus aureus*, isolados nos episódios de peritonite, foram estudadas quanto à associação com as variáveis da evolução clínica dos episódios: cura, remoção do cateter peritoneal, falência do método dialítico, hospitalização e óbito.

5.7. MÉTODOS ESTATÍSTICOS:

Para estudar as associações clínico-microbiológicas foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ou o teste exato de Fischer.

O efeito conjunto das diferentes variáveis (clínicas e microbiológicas) em algumas respostas binárias foi estudado através do modelo de regressão logística devido ao grande número de fatores que fazem parte do presente estudo. A seleção das covariáveis consideradas no modelo de regressão foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Collett (1991) [37].

Significância estatística foi definida como um valor de $P < 0,05$.

6. AGRADECIMENTOS:

À agência de fomento FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos pacientes atendidos da Unidade de Diálise do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu que serviram de matéria-prima para esse estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ganter G. On the elimination of toxic substances from the blood by dialysis. *Muench Med Wochenschr.* 1923; 70(2):1478-80.
2. Popovich RP, Moncrief JW, Decherd JF, Bomar JJB, Pyle WK. The definition of a novel portable-wearable equilibrium peritoneal technique. *Abst Am Soc Artif Intern Organs.* 1976; 5:64.
3. Oreopoulos DG, Robson M, Izatt G, Clayton S, De Veber GA. A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (DPCA). *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1978; 24:481-9.
4. Oreopoulos D. G., Tzamaloukas A. H. Peritoneal dialysis in next millennium. *Adv Ren Replace Ther.* 2000; 7:338-346.
5. Peçois-Filho R F S, Pasqual D D, Fuerbringer R, Sauthier S M, Riella M C. Diálise Peritoneal Contínua Ambulatorial (DPCA): Experiência de 15 anos em Curitiba . *J Bras. Nefrol.* 1998; 20 (I):22-30.
6. Krishnan M, Thodis E, Ikonopoulou D, Vidgen E, Chu M, Bargman J M, Vas S I, Oreopoulos D G. Predictors of outcome following bacterial peritonitis in peritoneal dialysis . *Perit Dial Int.* 2002; 22:573-81.
7. de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M, Montelli A C, Fioravante A M, Neves Batalha J E, Teixeira Caramori J C, Barretti P. Predictive factors of outcome following staphylococcal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol.* 2005; 64: 378-2.
8. Szeto C C, Chow K M, Kwan C H, Law M C, Chung K Y, Yu S, Leung C B, Li P K T. *Staphylococcus aureus* Peritonitis Complicates Peritoneal Dialysis : Review of 245 consecutive cases . *Clin J Am Soc Nephrol* . 2007; 2:245-51.
9. Kotsanas D., Polkinghorne K R, Korman T M, Atkins R C, Brown F. Risk factors for peritoneal dialysis-related peritonitis: Can we reduce the incidence and improve patient selection? *J Asian Pacific Soc Nephrol* . 2007; 12; 239-45.
10. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections . *N Engl J of Med* . 1998; 339; 520-32.
11. Dingues M.M., Orwin P. M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:16-34.
12. Kiem S, Oh W S, Peck K R, Lee N Y, Lee J Y, Song J H, Hwang E S, Kim E C, Cha Y C, Choe K W. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*

- by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *J.Korean Med Sci* . 2004; 19:779-82.
13. Cramton S E, Gerke C, Schnell N F, Nichols W W, Gotz F. The Intercellular Adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect and Immun* . 1999; 67(10): 5427–33.
 14. Lowy F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin. Invest.* 2003; 111(9):1265-73.
 15. Lopes H V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Rev Panam Infectol.* 2005; 7(3):34-36.
 16. Koneman, E.W. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1988; 840.
 17. Bunke C.M., Brier M.E., Golper T.A. Outcomes of single organism peritonitis in peritoneal dialysis: gram negatives versus gram positives in Network 9 Peritonitis Study. *Kidney Int.* 1997; 52:524-9.
 18. Gruer L.D., Barleiett R., Ayliffe G.A.J. Species identification and antibiotic sensitivity of coagulase negative staphylococci from CAPD peritonitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1984; 13:577-83.
 19. Barretti P., Bastos K.A., Dominguez J., Caramori J.C.T. Peritonitis in Latin América. *Perit. Dial. Int.* 2007; 27:332-9.
 20. Dasgupta M.K., Tyrrell J.W., Costerton R.A., Wan R.C., Bettcher K.B. Detection of sessile biofilm bacteria in culture negative CAPD associated peritonitis. *Adv CAPD*. 1988. Available from: <http://www.advancesinpd.com/adv88/pt4detection88.html>
 21. Al-Wali W.I., Elvin S.J., Mason C.M., Clark A., Tranter H.S. Comparative phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from line and non-line associated septicaemia, CAPD peritonitis, bone/joint infections and healthy nasal carriers. *J. Med. Microbiol.* 1998; 47:264-74.
 22. West T.E., Washe J., Krol C.P., Amsterdam D. Staphylococcal peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23:809-12.
 23. Fried L.F., Bernardini J., Johnston J.R., Piraino B. Peritonitis influence mortality in peritoneal dialysis patients. *J.Am. Soc. Nephrol.* 1996; 7:2176-82.
 24. Peacock S.J., Howe P.A., Day N. P., Crook D.W., Winearls C.G., Berendt A.R. Outcome following staphylococcal peritonitis. *Perit. Dial. Int.* 2000; 20:215-9.

25. Tranaeus A., Heimbürger O., Lindholm B. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD): diagnostic findings, therapeutic outcome and complications. *Perit.Dial. Int.* 1989; 9:179-90.
26. Han S.H., Lee S. C., Ahn S. V., Lee J.E., Choi H. Y., Kim B. S. *et.al.* Improving outcome of CAPD: Twenty-five years experience in a single korean center. *Perit. Dial. Int.* 2007; 27:432-40.
27. Lu Y., Hylander B., Brauner A. Interleukin-10, interferon gamma, interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptor alpha detected during peritonitis in the dialysate and serum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit.Dial.Int.* 1996;16:607-12.
28. Kim D.K., Yoo T.H., Ryu D.R., Xu Z.G., Kim H.J., Choi K.H. *et.al.* Changes in causative organisms and their antimicrobial susceptibilities in CAPD peritonitis: a single center's experience over one decade. *Perit.Dial.Int.* 2004;24:424-32.
29. Piraino B, Bailie G R, Bernardini J, Boeschoten E, Gupta A, Holmes C, Kuijper E J, Li P K, Lye W C, Mujais S, Paterson D L, Fontan M P, Ramos A, Schaefer F, Uttley L. ISPD Ad Hoc Advisory Committee: Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2005 update. *Perit Dial Int* 25:107-31.
30. Christensen, G.D. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 1982;37:318-26.
31. Lachica, R.U.F., Genigeorgis, C., Hoeprich, P.D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 1971;21:585-7.
32. Donnelly, C.B. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 1967;15:1382-7
33. Shingaki, M.H. Study on reversed passive latex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. *Annu. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. Publ. Hlth.*, 1981;32:128-31.
34. Pereira, M.L. Detection of nanogram quantities of staphylococcal enterotoxin by reversed passive latex agglutination (RPLA). (*In press*).
35. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008; 28:24-168.
36. Murakami, K.; Minamide, K.; Wada, K.; Nakamura, E.; Teraoka, H.; Watanabe, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1991, v. 29, p.2240-44.
37. Collet D. Modelling binary data. London: *Chapman & Hall*; 1991.

38. Kan G.W., Thomas M. C. B., Heath C.H. A 12-month review of peritoneal dialysis - related peritonitis in Western Australia: is empiric vancomycin still indicated for some patients? *Perit. Dial. Int.* 2003; 23:465-68
39. Lu P.L., Tsai J.C., Chiu Y.W., Chang F.Y., Hsiao C.F., Siu L.K. Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* carriage, infection and transmission in dialysis patients, healthcare workers and their family members. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; 23:1659-665.

Tabela1: Distribuição dos fatores clínicos e microbiológicos sobre a evolução dos 52 novos episódios (nova infecção) de peritonite.

Fatores	Cura (31)	Não Cura (22)
NºCasos (%)		
Características relacionadas ao paciente		
Faixa etária		
Idade menor ou igual a 60 anos	23 (74,2)	14 (63,6)
Idade maior que 60 anos	8 (25,8)	8(36,4)
Sexo		
Feminino	15 (48,4)	16 (72,7)
Masculino	16(51,6)	6 (27,3)
Diabetes mellitus(DM)		
Presença de DM	13 (41,9)	13 (59,1)
Ausência de DM	18 (58,1)	9 (40,9)
Raça		
Caucasianos	24 (77,4)	17 (77,3)
Não Caucasianos	7 (22,6)	5 (22,7)
Tratamento com Vancomicina		
Sim	12 (38,7)	15(68,2)
Não	19 (61,3)	7 (31,8)
Dados clínicos		
Febre	12(38,7)	7(31,8)
Hipotensão	4 (12,9)	7 (31,8)
Líquido Peritoneal Turvo	31(100)	20 (90,1)
Dor	24 (77,40)	12 (54,5)
Náusea/Vômito	14 (45,2)	6 (27,3)
Dados Microbiológicos		
Hemolisina α	13 (41,9)	11(50)
Hemolisina β	10 (32,2)	10 (45,5)
Biofilme	28 (90,3)	21(95,5)
Lipase	25 (80,6)	19 (86,3)
Lecitinase	28 (90,3)	22 (100)
DNase	31 (100)	19 (86,3)
TNase	28 (90,3)	20(90,1)
Toxina A	4 (12,9)	2 (9)
Toxina B	7 (22,6)	10(45,5)
Toxina C	9 (29)	3(13,7)
Toxina TSST-1	10 (32,2)	5(22,7)
Oxacilina Sensível	28(90,3)	17 (77,3)
Gene <i>mecA</i>	2(6,5)	4(18)

Tabela 2: Distribuição dos fatores clínicos e microbiológicos sobre a evolução dos 20 episódios repetidos ou recidivantes de peritonite.

Fatores	Cura (3)	Não Cura (17)
NºCasos (%)		
Características relacionadas ao paciente		
Faixa etária		
Idade menor ou igual a 60 anos	3 (100)	12 (70,6)
Idade maior que 60 anos	0	5 (29,7)
Sexo		
Feminino	2 (66,6)	14 (82,4)
Masculino	1 (33,3)	3 (17,6)
Diabetes mellitus(DM)		
Presença de DM	0	11(64,7)
Ausência de DM	3(100)	6 (35,3)
Raça		
Caucasianos	3(100)	10 (58,8)
Não Caucasianos	0	7(41,2)
Tratamento com Vancomicina		
Sim	3(100)	16(94,2)
Não	0	1(5,8)
Dados clínicos		
Febre	0	3 (17,6)
Hipotensão	0	3 (17,6)
Líquido Peritoneal Turvo	3(100)	17 (100)
Dor	3(100)	10(58,8)
Náusea/Vômito	1 (33,3)	7(41,2)
Dados Microbiológicos		
Hemolisina α	2 (66,6)	9 (52,9)
Hemolisina β	0	9 (52,9)
Biofilme	3(100)	14 (82,4)
Lipase	2 (66,6)	17(100)
Lecitinase	2 (66,6)	16 (94,2)
DNase	3(100)	16 (94,2)
TNase	3(100)	16 (94,2)
Toxina A	1 (33,3)	2 (11,8)
Toxina B	1(33,3)	5 (29,7)
Toxina C	0	1 (5,8)
Toxina TSST-1	2 (66,6)	4 (23,6)
Oxacilina Sensível	2 (66,6)	14 (82,4)
Gene <i>mecA</i>	0	3 (17,6)

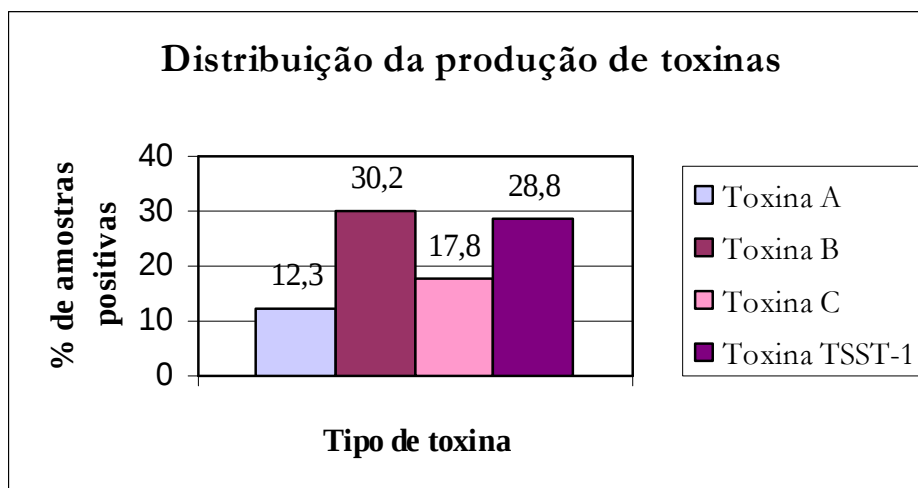


Figura 1: Distribuição da produção de toxinas pelas amostras de *S.aureus*.

Tabela 3: Resultados do ajuste do modelo de regressão logística aos dados de todos os episódios (nova infecção e repetição ou recidivas) e casos repetidos ou reincidentes em relação aos diferentes tipos de desfecho (somente os resultados significativos).

Fatores	Todos casos		Casos Novos	
	<i>p</i>	Razão de chance	<i>p</i>	Razão de chance
<i>Desfecho cura</i>				
Tipo de Surto	0,03	0,115	NS	-
<i>Diabetes miellitus</i>	0,40	0,324	NS	-
Toxina B	NS	-	0,22	0,191
Sensibilidade à oxacilina	NS	-	0,49	10,609
<i>Desfecho Retirada de Cateter</i>				
Tipo de Surto	0,45	3,296	NS	-
Toxina B	NS	-	0,30	5,549
Sensibilidade à oxacilina	NS	-	0,22	0,056
<i>Desfecho Hospitalização</i>				
Tipo de Surto	0,018	3,989	NS	-
Sensibilidade à oxacilina	NS	-	0,44	0,087
<i>Desfecho Óbito</i>				
Faixa Etária	0,007	27,049	NS	-
Cor	0,30	0,075	NS	-
<i>Sintoma Febre</i>				
<i>Diabetes miellitus</i>	NS	-	0,028	0,82

Tabela 4: Limites da concentração inibitória mínima (µg /ml) para sensibilidade e resistência do *S. aureus* e estafilococos coagulase negativa (ECN) de acordo com o CLSI [2008].

Agente antimicrobiano	Interpretação MIC (µg/mL)	
	Sensível	Resistente
Penicilina G	≤ 0.12	≥ 0.25
Oxacilina para <i>S. aureus</i>	≤ 2.0	≥ 4.0
Cefalotina	≤ 8.0	≥ 32
Levofloxacina	≤ 1.0	≥ 4.0
Ofloxacina	≤ 1.0	≥ 4.0
Vancomicina	≤ 2.0	≥ 16.0

Tabela 5: Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mec A*

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 bp
Primer	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 bp

Fonte: Murakami *et al.*, 1991.