

Fabiana Venegas Pires

Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Co-orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu/São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pires, Fabiana Venegas.

Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo : prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular / Fabiana Venegas Pires. - Botucatu: [s.n.], 2012

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

Orientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Coorientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Capes: 21202010

1. Estafilococos aureos. 2. Infecções estafilocócicas. 3. Microbacteriologia médica. 4. Nariz – Secreções – Fatores de risco. 5. Epidemiologia molecular. 6. Drogas – Resistência.

Palavras-chave: CA-MRSA; Colonização; Fatores de Risco; MRSA; Prevalência; *Staphylococcus aureus*.

A pesquisa que deu origem a esta dissertação foi possível graças ao auxílio da FAPESP (processo 2011/06988-2; projeto “Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular.”)

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A minha linda e alegre filha Laís, pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor.

Ao meu esposo e incondicional companheiro Diogo, por ter permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho, por compartilhar angústia e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis. Te amo muito!

Ao meu pai Vicente e a minha mãe Elena exemplos de força e dedicação.

Ao meu irmão Fábio e a minha pequena querida sobrinha Amarílis, mesmo longe incentivando sempre a realização desse sonho.



Agradecimentos

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Carlos sou grata não apenas pelo acompanhamento acurado do meu trabalho, orientando-me com precisão e competência indiscutível, mas também pelo apoio e estímulo que dispensou ao longo desse mestrado.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes pela co-orientação cuja competência e zelo terão sempre o meu reconhecimento, pois foi fundamental para esse trabalho.

Sou reconhecida e grata ao laboratório de Saúde Pública, pela ajuda na realização da operacionalização desse trabalho em especial à Profa. Dra. Luana Carandina, Rosângela, Eliane e Maria Luíza.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório de Bacteriologia: Marcos, Eliane, Maria Raquel, Natália, Danilo, Cláudia, Valéria, Taísa e Katherine.

Em especial aos meus grandes e queridos amigos Lígia, Mariana, Patrícia e Carlos pelo apoio e contribuição incalculável, sem vocês não seria possível à realização desse sonho.

*E a todas as pessoas que direta e indiretamente
contribuíram para concretização desse trabalho.*

Muito obrigada!!!



Epigrafe

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca vence o obstáculo, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar



Sumária

Sumário

RESUMO	14
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	20
1. <i>Staphylococcus aureus</i> : epidemiologia, patogênese e relevância clínica.....	21
2. Resistência Antimicrobiano.....	26
3. Estudos de base populacional sobre colonização/infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	30
4. Cenário Nacional.....	32
5. Justificativa.....	33
OBJETIVOS	34
MATERIAL e MÉTODOS	36
1. Local do estudo.....	37
2. População do estudo.....	38
3. Operacionalização.....	39
4. Coleta de dados demográficos e clínicos.....	40
5. Coleta de espécimes microbiológicos.....	41
6. Identificação da espécie.....	42
7. Testes de resistência à Meticilina.....	42
8. Extração de DNA bacteriano.....	43
9. Detecção molecular e caracterização de SCCmec.....	43
10. Pulsed-field gel electrophoresis.....	44
11. Tipagem molecular de MRSA por MLST.....	45
11.1 Extração de DNA	46
11.2 Amplificações dos genes para MLST.....	46
11.3 Sequenciamento e análise do MLST.....	46
12. Análise estatística dos resultados.....	47
13. Fluxograma.....	48
14. Questões éticas.....	49
RESULTADOS	51
1. Prevalência encontrada de <i>S.aureus</i> e MRSA na população geral do estudo.....	52
1.2 Prevalência de MRSA nos contactantes.....	52
2. Fatores de risco para colonização nasal por <i>S.aureus</i> e MRSA.....	53

3. Avaliação da atividade de drogas para antimicrobianas “ <i>in vitro</i> ”- Técnica da difusão da droga.....	53
3.1 Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência para meticilina.....	54
3.2 Determinação do tipo de SCCmec.....	55
3.3 Identificação clonal dos MRSA.....	56
3.4 Tipagem mecultr de MRSA por MLST.....	56
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO 1	85
ANEXO 2	89
ANEXO 3	92

Resuma

RESUMO

Estudos recentes apontam para elevação da incidência e gravidade das infecções por *Saphylococcus aureus*. Esse fato é agravado pela ampla disseminação de isolados resistentes à meticilina (*Methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) nos hospitais, e sua recente emergência na comunidade. A colonização nasal de indivíduos assintomáticos é a maior responsável pela persistência e disseminação de *S. aureus* nas populações humanas. Assim sendo, inquéritos de carreamento nasal são importantes para estimar a “carga”(burden) de *S. aureus* como um todo e de MRSA na comunidade. Este projeto tem por objetivo identificar a prevalência e fatores de risco para carreamento de *S. aureus* e MRSA em população de área urbana de Botucatu, São Paulo. Adicionalmente, o estudo se propôs a realizar caracterização molecular da clonalidade e resistência de isolados colonizantes nasais. Para tanto, foram selecionada uma amostra de 686 pessoas com mais de um ano de idade, estratificada por local de residência, gênero e idade. Foram colhidas secreções nasais por meio de *swabs*, que posteriormente foram semeados em meio de cultura. Ao mesmo tempo, foram identificados dados demográficos e clínicos dos sujeitos da pesquisa. Isolados de *S. aureus* foram submetidos a testes de suscetibilidade à meticilina/oxacilina (fenotípicos e genotípicos) e, se resistentes, à caracterização do cassete cromossômico SCCmec. Foi também realizada caracterização clonal dos isolados de MRSA por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Quando foram identificados carreadores de MRSA, foi obtidas amostras de seus contactantes domiciliares para caracterização de *clusters*. Análises estatísticas foram realizadas para identificar fatores de risco para carreamento de *S. aureus* como um todo e MRSA em particular. Prevalências de *S. aureus* e MRSA foram 32,7% (IC95%=29,2%-36,2%) e 0,9% (0,4%-1,8%), respectivamente. Fatores de risco independentes para colonização

por *S. aureus* foram gênero masculino (OR=1,57; IC95%=1,13-2,15; p=0,008) e história de infecção de pele recente (OR=1,97; IC95%=1,09-3,54; p=0,02). Houve relação inversa entre idade e colonização (OR=0,98, IC95%=0,97-0,99, p<0,001). Antecedente de infecção de pele foi o único preditor identificado para colonização por MRSA (OR=9,64; IC95%=1,60-57,97; p=0,01). Todos os seis isolados de MRSA carregavam o cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*) tipo IV. A tipagem molecular revelou presença de dois clones, ST-5 e ST-1176. Nenhum dos sujeitos colonizados com MRSA tinha história de contato recente com serviços de saúde, e dois deles apresentaram contactantes domiciliares colonizados por cepa com perfil eletroforético 100% idêntico. Concluindo, nosso estudo demonstrou prevalências de colonização de indivíduos assintomáticos por *S. aureus* e MRSA semelhantes às relatadas nos Estados Unidos. A circulação de clones resistentes na comunidade exige reavaliação das medidas de controle e tratamento de infecções estafilocócicas.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, CA-MRSA, prevalência, colonização, fatores de risco.



Abstract

ABSTRACT

Recent studies point out to increasing incidence and severity of infections caused by *Staphylococcus aureus*. This phenomenon is aggravated by the widespread dissemination of methicillin-resistant isolates (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) in hospitals, and their recent emergence in the community. The nasal colonization of asymptomatic individuals is a determinant of the persistence and spread of *S. aureus* in human populations. Therefore, investigations of nasal carriage are important for estimating the burden of *S. aureus* as a whole and of MRSA in the community. This study aimed to identify the prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *S. aureus* and MRSA in the urban population in the city of Botucatu, São Paulo. Additionally, the study included molecular characterization of resistance and strain typing of isolates. We selected a sample of 686 people over one year of age, stratified by place of residence, gender and age. Nasal secretions were screened with swabs, which were plated in culture medium. We also aimed to identify demographic and clinical data of the study subjects. Isolates of *S. aureus* were tested for susceptibility to methicillin / oxacillin (phenotypic and genotypic test) and, if resistant, to the characterization of chromosome cassette SCCmec. Clonal characterization of MRSA isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) was also performed. When MRSA carriers were identified, samples were obtained from their household contacts in order to characterize clusters. Statistical analyzes were performed to identify risk factors for carrying of *S. aureus* as a whole and MRSA. Prevalence of *S. aureus* and MRSA carriage were 32.7% (95% CI = 29.2% - 36.2%) and 0.9% (0.4% -1.8%), respectively. Independent risk factors for colonization by *S. aureus* were male gender (OR, 1.57; 95% CI, 1.13-2.15, $P=0.008$) and history of recent skin infection (OR, 1.97; 95%CI, 1.09-3.54; $P=0.02$). There was an inverse

relation between age and colonization (OR,0.98; 95%CI, 0.97-0.99; $P < 0.001$). Recent skin infection was the only independent predictor of MRSA colonization (OR, 9.64; 95%CI, 1.60-57.97; $P=0,01$). All six MRSA isolates carried the estafilocóccico chromosome cassette (SCCmec) type IV. Molecular typing revealed the presence of two clones, ST-5 and ST-1176. None of the subjects colonized with MRSA had recent contact with health services, and two household contacts were colonized with identical strains. In conclusion, our study showed prevalence of asymptomatic colonization by *S. aureus* and MRSA similar to those reported in the United States. The presence of resistant clones in the community is a sound argument for re-evaluation of control measures and treatment of staphylococcal infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, CA-MRSA, prevalence, colonization, risk factors



Introdução

INTRODUÇÃO

1. *Staphylococcus aureus*: epidemiologia, patogênese e relevância clínica.

Estudos recentes afirmam que a cada três pessoas uma é colonizada com *Staphylococcus aureus*, e estimam que haja dois bilhões de pessoas carregando essa bactéria por todo o mundo¹.

Esse microrganismo oportunista é considerado atualmente um dos patógenos humanos mais relevantes. Em indivíduos saudáveis, ele integra a microbiota da pele, superfícies das mucosas e frequentemente a mucosa nasal anteriores. Estas últimas são consideradas o sítio primário da sua colonização e seus reservatórios naturais são o homem e outros animais de sangue quente^{2,3} Esta bactéria tem o potencial de causar diversas doenças, que incluem desde infecções de pele e de tecidos moles a quadros infecciosos invasivos e potencialmente fatais, como bacteremia, pneumonia, endocardite e sepse (**quadro 1**)^{4,5} Ainda que esta bactéria seja conhecida como um patógeno relevante há mais de um século, só recentemente foram elucidados seus diferentes fenótipos de virulência. Estes desempenham um papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes, na evasão da resposta imunológica e resistência a antimicrobianos.^{5,6,7}

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

Origem	Síndromes
Adquiridas na comunidade	Toxi-infecções alimentares
	Infecções de pele e partes moles: foliculites, erisipelas, celulites
	Síndrome do choque tóxico
	Pneumonias
	Endocardites
	Osteomielites
	Abscessos de órgãos sólidos
Adquiridas em hospitais ou em outros serviços de saúde	Infecções de sítio cirúrgico
	Infecções da corrente sanguínea
	Pneumonias
	Infecções de pele e partes moles

Infecções estafilocócicas ocorrem frequentemente em pacientes hospitalizados e podem ter consequências graves, mesmo com instituição da terapia antimicrobiana. Esse aspecto, entre outros, renovou o interesse em na epidemiologia e controle de *S. aureus*.^{8,9}

O gênero *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos pelo cirurgião escocês Alendes Ogston e atualmente é um dos microorganismos mais comuns em infecções piogênicas em todo mundo¹⁰. Atualmente, esse gênero compreende 45 espécies, sendo que cerca de 15 dessas espécies são

potencialmente patogênicas aos humanos.¹¹ As infecções por estafilococos são amplamente disseminadas na comunidade e em serviços de saúde.¹⁰

O *S. aureus* caracteriza-se morfológicamente como agrupado de cocos Gram-positivos com forma de cachos (do grego, *Staphilé*=cachos de uva). Diferencia-se dos demais membros do gênero *Staphylococcus* pela produção da coagulase, embora outras espécies com menor relevância clínica também tenham a capacidade de sintetizar essa enzima.¹²

Além disso, *S. aureus* é capaz de sobreviver em superfícies inanimadas por longo período de tempo. É significativamente capaz de resistir ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira.^{13,14}

Se, por um lado, a prevalência de colonização por *S. aureus* na população tem se mantido estável ao longo dos anos, a proporção de pessoas que carregam *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) está cada vez maior, o que desperta interesse especial de clínicos e epidemiologistas.¹⁵ O MRSA é reconhecido há quatro décadas como uma séria ameaça aos pacientes hospitalizados. No entanto, a recente emergência de isolados na comunidade representa um desafio para a saúde pública.¹⁶

A colonização nasal por *S. aureus* pode se manifestar sob diferentes padrões temporais em indivíduos saudáveis: 10-35% desses carregam *S.aureus* persistentemente e 20-75% o carregam intermitentemente. Por outro lado, entre 5 e 50% das pessoas nunca chegam a carrear *S.aureus* na mucosa nasal.^{17,18} Além disso, o número de células de *S.aureus* na mucosa nasal é significativamente maior em carregadores persistentes que naqueles que carregam a bactéria de forma intermitente, resultando em um fator de risco elevado para infecções por *S.aureus* na primeira categoria de indivíduos. Essa forma de carregamento tem sido identificada como um forte fator para infecções subsequentes.^{19,}
^{20,21} Esse fenômeno de carregamento de bactéria sem sinais clínicos é chamado de

“colonização”.²² A colonização por *S.aureus* tem início após o nascimento e recorre diversas vezes ao longo da vida. Ela é responsável pela persistência e disseminação dos *S. aureus* em populações humanas, além de ter sido identificada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções por *S. aureus* tanto na comunidade como nos hospitais.

Embora a mucosa nasal seja o nicho principal para colonização *S.aureus*, há outros sítios de colonização, como axila, períneo e trato gastrointestinal.^{23,24} A relação entre carreamento e transmissão em ambiente hospitalar e na comunidade tem sido objeto de estudos epidemiológicos. Alguns destes sugerem que o carreamento nasal contribui para transmissão das bactérias por disseminação aérea.¹⁰

O grande sucesso de *S. aureus* como colonizante e agente de infecções está associado à expressão de diferentes fenótipos de virulências. Estes fenótipos são responsáveis por diferentes etapas do processo de colonização e infecção, e são sumarizados no **quadro 2**.²⁵

Quadro 2. Fenótipos de virulência de *Saphylococcus aureus*.

Natureza	Fenótipo	Descrição e Relevância
Componentes da Superfície celular	Biofilmes	Crescimento comunitário de bactérias, envoltas em matriz polissacáride, que permite maior adesão a superfícies e reduz suscetibilidade a antimicrobianos.
	Cápsula	Componente polissacáride que envolve a célula bacteriana e a protege contra fagocitose.
	Adesinas	Substâncias que conferem adesão a diversas proteínas presentes nos tecidos do hospedeiro.
	Ácidos teicóicos	Componentes da parede bacteriana, parecem ter função na adesão a epitélios.
Enzimas e Hemolisinas	Hemolisinas	Enzimas capazes de destruir eritrócitos e outras células eucariontes. Sua importância como determinante de patogênese foi demonstrada em modelos experimentais de endocardite.
	Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL)	Hemolisina associada com extensa necrose tecidual, responsável por infecções de pele graves e pneumonias necrotizantes. Está presente principalmente em isolados de <i>S. aureus</i> resistente à metilina adquiridos na comunidade.
Toxinas esfoliativas	Toxinas associadas à Síndrome da Pele Escaldada	Determinam clivagem de camadas profundas do epitélio, causando quadros de eritema e descamação disseminados (Síndrome da Pele Escaldada) ou lesões bolhosas localizadas (impetigo bolhoso).
Superantígenos	Enterotoxinas	Antígenos capazes de ligar-se diretamente à receptores de linfócitos, as enterotoxinas ingeridas em alimentos são associadas a quadros (geralmente auto-limitados) de diarreia e vômitos.
	Toxina associada à Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)	Superantígenos associados a quadro clínico de febre alta, exantema e extravasamento de líquido em vasos capilares, resultando hipotensão e edema. Isso resulta na Síndrome do Choque Tóxico, causada por <i>S. aureus</i> colonizando tecidos distantes. Uma das formas dessa síndrome foi associada ao uso de tampões vaginais.

Os diferentes fatores de virulência apresentados no **quadro 2** mostram que, se por um lado, a eficácia da infecção depende amplamente de adesão, invasão e destruição dos tecidos infectados, por outro, algumas doenças estafilocócicas são causadas “à distância”, pela produção de exotoxinas, que incluem a “Síndrome da Pele Escaldada” e a “Síndrome do Choque Tóxico”, duas condições potencialmente graves.²⁶ Além disso, a ingestão de enterotoxinas produzidas por *S. aureus* e presentes em

alimentos está associada a quadros de intoxicação alimentar, caracterizados por náuseas e vômitos.²⁷

Vale ressaltar que o poder infeccioso do *S. aureus* está associado tanto à capacidade de invasão e disseminação nos tecidos quanto à capacidade de sintetizar substâncias patogênicas que resultem na sua permanência no local infectado (como as leucocidinas).²⁸

Além dos fenótipos de virulência, é marcante a presença de fenótipos de resistência aos antimicrobianos em *S. aureus*. Infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistente a antibióticos tem atingido proporções epidêmicas mundiais.²⁹

2. Resistência a antimicrobianos

A implantação da antibioticoterapia no início da década de 1930 , com emprego das sulfanilamida (descoberta por Gerard Domagk, em 1932), fez com que diversos pesquisadores previssem o fim das doenças infecciosas como fator de morbidade e mortalidade. Essa previsão não se concretizou. Ao analisar a evolução da resistência do *S. aureus*, perceber-se que, já no final dessa década, surgiram as primeiras cepas de resistentes aquele quimioterápico.³⁰

Sendo assim, tornou-se um motivo de preocupação essa evolução da resistência antimicrobiana . De fato, desde o início da “era dos antibióticos”, essa espécie provou-se capaz de desenvolver resistência a quase todas as classes de antimicrobianos disponíveis na prática clínica.¹⁴

Esse fenômeno de resistência a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento das infecções bacterianas, gerando uma ameaça para saúde pública. *S. aureus* destaca-se por apresentar uma grande versatilidade no seu mecanismo de resistência aos antimicrobianos, emergindo, assim

como uma das causas mais relevantes não só de infecções nosocomiais como comunitárias.³¹

Entrando em uso clínico a penicilina, *S.aureus* passou a desenvolver resistência a esse beta-lactâmico, pela produção de uma betalactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o núcleo molecular desse antimicrobiano. Em 1959 esse fato já gerava uma extensa resistência, alcançando uma taxa de 80% para isolados hospitalares. Ressalte-se que havia resistência cruzada com amoxicilina e ampicilina.³²

A meticilina e outras penicilinas resistentes à destruição penicilinase pareciam uma solução para esse problema. No entanto, em 1961 as cepas de isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (conhecidos pela sigla MRSA, do inglês *methicillin-resistant S. aureus*) surgiram na Europa, rapidamente emergindo como uma séria ameaça à saúde pública mundial.^{33,34} Permanecem sendo um dos patógenos mais frequentes adquiridos no hospital.³⁵

Um fenômeno mais preocupante se observou na década de 1990: a identificação de MRSA em pessoas sem história de exposição a ambiente hospitalar.³⁶ Nesse cenário diferenciaram-se dois padrões epidemiológicos desses microrganismos problema: HA-MRSA (*Hospital-acquired* [adquiridos no hospital]-MRSA) e CA-MRSA (*Community-associated* [associados à comunidade]-MRSA).³⁷ Suas principais diferenças estão descritas no **quadro 3**.³⁸

Quadro 3: Diferenças entre os seus subtipos de MRSA

	HA-MRSA	CA-MRSA
Manifestação clínica predominante	Infecções de sítio cirúrgico, ostiomelites, pneumonias.	Infecções graves de pele e partes moles, abscessos, pneumonias.
Fatores de risco	Dispositivos de longa permanência, hospitalização prolongada, casa para idosos e uso de antibióticos a longo prazo	Contato físico próximo, baixas condições de higiene, instalações sanitárias compartilhadas, indivíduos que vivem em locais superlotados, (ex. recrutas militares e prisioneiros)
Características moleculares	SCC <i>mec</i> tipos I, II ou III PVL é menos comum	Principalmente o SCC <i>mec</i> tipo IV ,V e VI PVL é mais comum

A resistência à meticilina é causada principalmente por alteração no receptor celular dos beta-lactâmicos, a proteína ligadora da penicilina (PBP, *penicillin-binding protein*). A presença de PBP2a, que tem baixa afinidade por beta-lactâmicos, permite à bactéria sobreviver e reproduzir-se na presença desses antimicrobianos.³⁹ Por essa razão, o MRSA é resistente a todas as penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos utilizados na prática clínica.

O gene codificador da PBP2a (*meccA*) está localizado em uma “ilha genômica” de resistência, conhecida como cassete cromossômico estafilocócito *mec* (SCC*mec*, *Staphylococical chromosome cassette mec*). Pelo menos onze tipos de SCC*mec* foram

descritos até o momento.⁴⁰ A hipótese mais aceita atualmente é de que esses cassetes foram adquiridos em diferentes ocasiões a partir de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa, gerando linhagens não relacionadas de MRSA.⁴¹ SCC mec I, II e III são encontrados em HA-MRSA. Esses cassetes são maiores e albergam diversos determinantes de resistência. Por essa razão, isolados hospitalares de MRSA costumam apresentar resistência simultânea a várias classes de antimicrobianos. Por outro lado, SCC mec IV, V, VI – encontrados predominantemente em CA-MRSA - têm tamanho menor e carregam menos genes de resistência. No entanto, estão associados à presença de genes codificadores da PVL e de outras exotoxinas que conferem aos CA-MRSA maior virulência.⁴² Essas cepas estão associadas a infecções graves de pele e pneumonias necrotizantes.⁴³

As opções terapêuticas para MRSA (e em particular HA-MRSA) são escassas. Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) apresentam a melhor atividade contra essas cepas. No entanto, isolados com suscetibilidade intermediária a esse agentes foram descritos na década de 1990.⁴⁴ Ainda mais preocupante é a recente emergência de *S. aureus* com resistência completa aos glicopeptídeos, que se deve à aquisição de genes *VanA* a partir de enterococos resistentes à vancomicina. Felizmente, esse fenótipo tem distribuição restrita, com apenas sete casos descritos nos Estados Unidos.⁴⁵ Novas drogas com atividade antiestafilocócica (como a linezolida e a daptomicina) são uma opção para *S. aureus* resistente a glicopeptídeos. No entanto, resistência parcial ou completa a esses agentes já foi detectada.^{46,47}

3. Estudos de base populacional sobre colonização/infecção por *Staphylococcus aureus*.

A crescente incidência de quadros graves e de isolados multirresistentes de *S. aureus* motivou uma série de estudos que tinham por objetivo quantificar a carga (*burden*) da colonização e infecção estafilocócicas na população.

Uma dessas iniciativas, capitaneada pelos Centros para Prevenção e Controle de Doenças (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*), procurou descrever a incidência e distribuição de doenças invasivas por MRSA nos Estados Unidos.⁴⁸ Em nove cidades norte-americanas foi realizada vigilância ativa dessas infecções durante os anos de 2004 e 2005. Foram identificadas 8.987 infecções. Destas, 85,0% haviam sido adquiridas em hospitais e outros serviços de saúde, enquanto 13,7% eram de origem comunitária.

Outra pesquisa recente utilizou dados secundários do sistema de saúde britânico para estimar o comportamento epidemiológico das infecções estafilocócicas durante as décadas de 1990 e 2000.⁴⁹ Os autores apresentaram achados alarmantes: um aumento de cinco vezes nas hospitalizações por sepse, pneumonia estafilocócica, síndrome da pele escaldada e impetigo; aumento de três vezes das internações por abscessos e celulites, e de 150% nas admissões por infecções de ossos e articulações. Nas unidades básicas de saúde, a prescrição de antibióticos antiesfilocócicos cresceu 1,8 a 2,5 vezes entre 1991 e 2006.

Outros estudos procuraram quantificar o carreamento de *S. aureus* na população. Nos anos de 2001 e 2002, incluiu-se no estudo NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) a coleta de amostras de nasofaringe. O estudo NHANES é realizado em âmbito nacional e corresponde a uma amostra representativa da população civil não institucionalizada dos Estados Unidos. A triagem para carreamento

nasal de *S. aureus* foi realizada em todos os indivíduos com idade acima de um ano participantes do estudo. Os resultados foram descritos e analisados em três publicações.^{50,46,47} Em 9622 participantes, a prevalência de colonização por *S. aureus* foi de 32,4%. Colonização por MRSA estava presente em 0,8%. Fatores significativamente associados ao carregamento de *S. aureus* foram: idade menor que 6 anos, adultos que não haviam completado o ensino médio, e diagnóstico de asma.

O carregamento de MRSA estava associado à idade maior que 65 anos, sexo feminino, diabetes e estadia recente em casas de repouso (mas não em hospitais). Um acompanhamento desse estudo em anos posteriores demonstrou que a prevalência do carregamento de *S. aureus* sofreu redução estatisticamente significativa, caindo para 28,6% em 2003-2004. Nesse mesmo período, porém, taxas de carregamento de MRSA quase duplicaram (0,8% para 1,5%, $p < 0.05$).⁵¹

Os dados do NHANES são bastante abrangentes, embora seu significado seja limitado pelo longo período decorrido desde o estudo. Outras publicações apresentam estimativas populacionais de carregamento de *S. aureus* ou MRSA em espaços mais restritos. Furya et al investigaram o carregamento nasal de MRSA em uma amostra de 739 habitantes de Manhattan, identificando prevalência de 0,3%.⁵² Outro estudo, realizado em Birmingham (Inglaterra), investigou 274 pacientes, identificando taxas de carregamento de 33,0% para *S. aureus* e 1,5% para MRSA.⁵³ Em Taiwan, Lu et al realizaram triagem para carregamento nasal de MRSA em 1.838 pessoas da comunidade e 393 indivíduos com contato com serviços de saúde.⁵⁴ No primeiro grupo, a prevalência de colonização foi de 3,6%. No segundo, os resultados foram: 5,0% (profissionais da saúde), 5,8% (pacientes em enfermaria de agudos), 5,9% (pacientes de hemodiálise) e 11,0% (indivíduos em instituições de longa permanência).

4. Cenário nacional

Embora não existam estimativas seguras, é razoável inferir que as infecções estafilocócicas sejam bastante incidentes na população brasileira. Em um relato do programa SENTRY, *S. aureus* foi o agente mais frequentemente isolado em espécimes clínicos de hospitais brasileiros. Ele manteve a liderança entre os agentes de infecções de tegumento e corrente sanguínea, e ficou em segundo lugar entre os agentes de pneumonias.⁵⁵ Dados mais recentes confirmaram esse padrão, e identificaram resistência à meticilina em 31,0% dos isolados.⁵⁴ 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 16,3% das hemoculturas colhidas em Unidades de Terapia Intensiva. Ao todo, 58,2% dos isolados eram de MRSA.⁵⁵ A ampla disseminação de MRSA em hospitais do Brasil é bem documentada, e um clone endêmico brasileiro (portador de SCCmec III) foi extensamente caracterizado.^{56,57}

Por outro lado, relatos sobre CA-MRSA no Brasil são ainda incomuns. Nascimento-Carvalho et al⁵⁸ relatam a identificação de 125 infecções por MRSA possivelmente adquiridas na comunidade, mas não realizaram caracterização molecular desses isolados.⁵⁹ Por outro lado, relatos de casos isolados⁶⁰ e estudos em bancos de cepas^{61,62} documentaram a disseminação de isolados de MRSA carreando SCCmec IV em centros urbanos do país. É interessante que, em muitos casos, infecções por MRSA portador de SCCmec IV tinham sido adquiridas em serviços de saúde.⁶¹⁻⁶³

5. Justificativa do estudo

Os argumentos apresentados acima demonstram a necessidade de se realizar estudos de base populacional em nosso país. Tais estudos podem fornecer dados relevantes para a compreensão da epidemiologia da colonização e infecção por *S. aureus* e apoio para abordagem clínica de pacientes.

Entre as informações relevantes que podem ser obtidas de um estudo com esse delineamento transversal, encontram-se: estimativa da prevalência de colonização por *S. aureus* e CA-MRSA na comunidade, identificação dos fatores de risco associados a essa colonização.

Nosso estudo visou abordar a população de Botucatu, município de aproximadamente 122.000 habitantes. Apesar do pequeno porte, o município alberga um hospital universitário com 400 leitos ativos. A maior parte da população é usuária desse hospital, onde o MRSA é endêmico. Assim sendo, acreditamos que o município é um espaço privilegiado para estudo não só da prevalência de colonização de *S. aureus* como um todo e CA-MRSA, como também da possível identificação de fenômenos como o carreamento e disseminação de HA-MRSA na comunidade.⁵⁴ Acrescente-se a isso o fato de que o município foi participante do inquérito multicêntrico de saúde do Estado de São Paulo⁶⁴, o que possibilitou o acesso dos pesquisadores a uma amostra populacional já estratificada por setor censitário, gênero, idade e classe social.



Objetivos

OBJETIVOS

1. Objetivos gerais:

- Identificar prevalência e fatores de risco para colonização nasal por *Saphylococcus aureus* em população de área urbana de Botucatu, São Paulo.
- Identificar prevalência e fatores de risco para colonização nasal por *Saphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em população de área urbana de Botucatu, São Paulo.
- Caracterizar epidemiologia molecular de clones de *Saphylococcus aureus* colonizantes de nasofaringe na população estudada.

2. Objetivos específicos:

- Identificar resistência à meticilina nos isolados do estudo por métodos fenotípicos e genotípicos.
 - Caracterizar o cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec) dos isolados colonizantes de MRSA.
 - Identificar e caracterizar *clusters* domiciliares de MRSA.
-

Material e Métodos

METODOLOGIA

1. Local do estudo

O município de Botucatu localiza-se a 22°53'09" de latitude sul, 48°26'42" de longitude oeste e a 804 metros de altitude. Dista 235 km de São Paulo. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) identificou população de 122.659 habitantes no censo de 2010. A **figura 1** apresenta um mapa do município.

Figura 1. Mapa do município de Botucatu.



Mais de 95% da população do município reside em área urbana. No inquérito multicêntrico de saúde de São Paulo⁶³, 25% da população entrevistada referia algum problema de saúde nos últimos 15 dias e 92% destes haviam procurado assistência médica. Em quase 40% dos casos, essa assistência foi procurada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Universidade Estadual Paulista – UNESP).

O presente estudo foi realizado em área urbana do município de Botucatu: previamente mapeada durante o inquérito de saúde.

2. População do estudo

Foram incluídos no estudo pessoas com mais de um ano de idade residentes em área urbana de Botucatu e que consentiram em participar voluntariamente da pesquisa.

Foi estudada inicialmente uma amostra populacional estratificada por idade, gênero e local de residência. Para o cálculo do tamanho amostral utilizamos os seguintes parâmetros:

- População do município: 122.659 habitantes.
- Prevalência estimada do carreamento de *S. aureus* (segundo NHANES^{46,47,50}): 32,4%.
- Margem de erro: 5%.
- Efeito de desenho do estudo: 2.0.

Aplicou-se a fórmula: $n = [DEFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p)]$.⁶⁵

Com esses parâmetros a população total estimada para o estudo (com nível de confiança de 95%) foi de 672 sujeitos. Por razões operacionais, esse número foi ampliado para 686. Além destes, uma segunda etapa do estudo incluiu contactantes familiares dos pacientes em que foi identificado carreamento de MRSA (veja a seguir).

3. Operacionalização

Amostragem foi realizada com conglomerados (domicílios, residências) na zona urbana do Município de Botucatu. Foram utilizados os mapas dos setores censitários usados na Contagem Populacional do IBGE, em 2007, para o cadastro ordenado dos domicílios residenciais, respeitando as quadras sorteadas e seu sentido de percurso (sentido horário respeitando as faces identificadas dos quarteirões).

Para realizar a operacionalização deste projeto foi preparada uma listagem de endereços de todos os setores censitários com seus respectivos domicílios visitados. A digitação foi realizada, aleatoriamente, na sequência que o material (entrevistas) era realizada (sempre feito por setores inteiros, com o número de entrevistas realizadas que compunham a sua respectiva amostra: setor x quarteirões enumerados e sorteados, com reserva de sorteio para possíveis reposições de domicílios).

A partir desta listagem dos 1.351 domicílios, distribuídos em 194 setores censitários, que identificavam 4.113 pessoas, foi realizado o sorteio dos seguintes estratos: 1-11 anos (sem distinção de gênero), 12-19 feminino, 12-19 masculino, 20-59 feminino, 20-59 masculino, 60 ou mais feminino, 60 ou mais masculino. Procedeu-se então a identificação nos domicílios que constavam na listagem.

Com o objetivo de facilitar às visitas de campo as faixas etárias sorteadas e identificadas no domicílio correspondente foram agrupadas por proximidade, utilizando os mapas das áreas de abrangência das Unidades de Saúde (p/facilitar o acesso: identificação e localização de endereços).

A reposição dos domicílios e suas respectivas faixas etárias foram realizadas, garantindo o critério de aleatoriedade (após esgotar os endereços sorteados, a reposição foi realizada com o domicílio imediatamente seguinte ao domicílio sorteado, pertencente à mesma base de seleção, mantendo a representatividade da amostra).

Os sujeitos foram incluídos após assinatura do TCLE (**anexo 1**) (p/ os menores de 18 anos foi solicitada a assinatura do responsável legal).

O questionário com informações pessoais teve duração em média de 10 minutos. O laboratório de Saúde coletiva colaborou na escolha dos domicílios visitados, sempre agrupando endereços para facilitar o acesso e localização da área a ser visitada.

Os questionários foram digitados em um banco controle em EPI INFO 3.5 (*Centers for Diseases Control and Prevention, USA*) respeitando a amostra para cada uma das faixas etárias.

4. Coleta de dados demográficos e clínicos

Antes de realizar a coleta do espécime microbiológico, foi aplicado questionário aos sujeitos da pesquisa. Tal questionário apresentado no **anexo 2** incluiu:

- Dados demográficos (gênero, idade, cor, religião);
 - Escolaridade;
 - Renda familiar;
 - Prática de esportes (individuais ou coletivos);
 - Morbidade referida (incluindo doenças crônicas);
 - Utilização de serviços de saúde (incluindo internações e outros procedimentos) nos últimos 12 meses;
 - Ocorrência de infecções nos últimos 12 meses;
 - Utilização de antimicrobianos nos últimos 12 meses;
 - Frequência em instituição fechada (creche, casa de repouso, presídio).
 - Uso de álcool e drogas ilícitas (especialmente endovenosas).
-

Para pacientes com internação no HC-UNESP no último ano, estava prevista a possibilidade de avaliação do prontuário para que se complementassem informações sobre:

- Doença de base (conforme CID10);
- Gravidade (medida por *scores* de Charlson⁶⁶ e Apache II⁶⁷, quando possível);
- Procedimentos realizados;
- Uso de dispositivos invasivos e de antimicrobianos;
- Culturas prévias com crescimento de *S. aureus*;
- Culturas prévias com crescimento de outros microorganismos.

A ficha de coleta de dados do prontuário está exposta no **Anexo 3**. *No entanto, dada a baixa prevalência de sujeitos com internação prévia recente, essa etapa não foi realizada.*

5. Coleta de espécimes microbiológicos

Amostras da nasofaringe foram coletadas através de *swabs*. A técnica de coleta incluiu a umidificação do *swab* com SF 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas às narinas, até a maior profundidade tolerável pelo sujeito da pesquisa, e rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. 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 Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 24 horas as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos microrganismos isolados.

6. Identificação da espécie

Os microrganismos que se desenvolveram nas culturas foram submetidos à coloração de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram feitas as provas de catalase e coagulase em tubo conforme preconizado por Koneman et al.⁶⁸ Foram realizadas as provas adicionais de Maltose, Trealose, Manitol e Polimixina B, para diferenciação de outras espécies de estafilococo coagulase positiva

7. Testes de resistência à meticilina

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados *S.aureus* obtidos através da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).⁶⁹ 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 utilizadas foram: Oxacilina (1 ug) e Cefoxitina (30 ug). Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de swab estéril na superfície de Agar Mueller Hinton, e a seguir aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI. A linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle em todos os experimentos.

8. Extração de 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 ul da solução de extração foram adicionados à mistura e esta 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 descartado e 500 ul de solução de extração e foi adicionada novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500ul da solução de lavagem foi adicionado 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 ul de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição.

9. Detecção molecular e caracterização de SCCmec

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al,⁷⁰ utilizando os primers *mecA1* e *mecA2*. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando-se um método de reação PCR-Multiplex, conforme descrito por Milheiriço et al.⁷¹ Foram utilizados 8 loci (A-H), selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente. O locus A está localizado downstream ao gene *pls* e é específico para o SCCmec tipo I; o locus B é um fragmento interno do operon *kdp*, que é específico para o SCCmec tipo II; o locus C é um fragmento interno do gene *mecl* presente nos SCCmec tipos II e III; o

locus D é um fragmento interno da região *dcx*, 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 a junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110; o *locus* H corresponde a junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181.

10. Pulsed-field gel electrophoresis

O PFGE das amostras de *Staphylococcus* spp. cultivados foram feitas segundo o protocolo modificado de McDougal *et al.*⁷². As amostras foram colocadas em caldo BHI onde cresceram por 24h. Em um microtubo, as amostras crescidas (400µl do caldo quando ECN e 200µl quando *S. aureus*) foram centrifugadas a 12.000rpm por 1min. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min a 37°C. Após 10min foram adicionados 5µl de Lisostafina (Lysostaphin from *Staphylococcus* lyophilized powder, Sigma-Aldrich) com agitação em vortex, mantendo as amostras no banho antes e depois de adicionar a lisostafina. Foram adicionados 300µl de agarose low melt 1,8% (Agarose-LowMelt, USB, USA) a 37°C e as amostras foram despejadas nos moldes para plugues até que solidificassem e, então, colocadas em placa de 24 poços com 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 (over night). O EC foi retirado e os plugues foram lavados com 2ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora.

Para a restrição do DNA genômico foi usado 1/3 de um plugue e 2µl da enzima SmaI (Fast Digest SmaI, Fermentas Life Science, Canadá). A restrição foi feita em placa de 96 poços adicionando-se primeiramente o tampão sem a enzima (45µl de água milli Q e 5µl do tampão da enzima) deixando a placa na geladeira por 30min. Em seguida, o tampão sem enzima foi retirado e adicionado o tampão com a enzima (43µl de água milli Q, 5µl do tampão da enzima e 2 µl da enzima) deixando a placa na estufa a 37°C por 6 min segundo especificações do fabricante. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed (400ml de água destilada e 30 µl de GelRed)(10.000X em água, Biotium, EUA) por 1h, e fotografados sob transiluminação UV. Para análise de similaridade, cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) foi utilizado o software BioNumerics (versão 6.1; Applied Maths, Bélgica).

A tolerância da posição das bandas e a otimização foram ajustadas para 1.25 e 0.5% respectivamente. Um coeficiente de similaridade de 80% foi escolhido para determinação dos clusters.

11. Tipagem molecular de MRSA por MLST

Os seis *S. aureus* que apresentaram o gene *mecA* e perfis clonais distintos foram tipados pelo MLST.

11.1. Extração de DNA

O DNA utilizado nesta técnica foi o mesmo do item 8.

11.2. Amplificação dos genes conservados para o MLST

Os genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL* foram amplificados separadamente com os primers abaixo, conforme descrito por Enright et al(2000).⁷³

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação dos 7 genes conservados

Gene	Primers	Sequência	Fragmento
arc	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'	
aroE	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'	
glpF	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'	
Gmk	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'	
Pta	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'	
Tpi	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'	
yqiL	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'	

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 será realizada.

11.3. Sequenciamento e análise do MLST

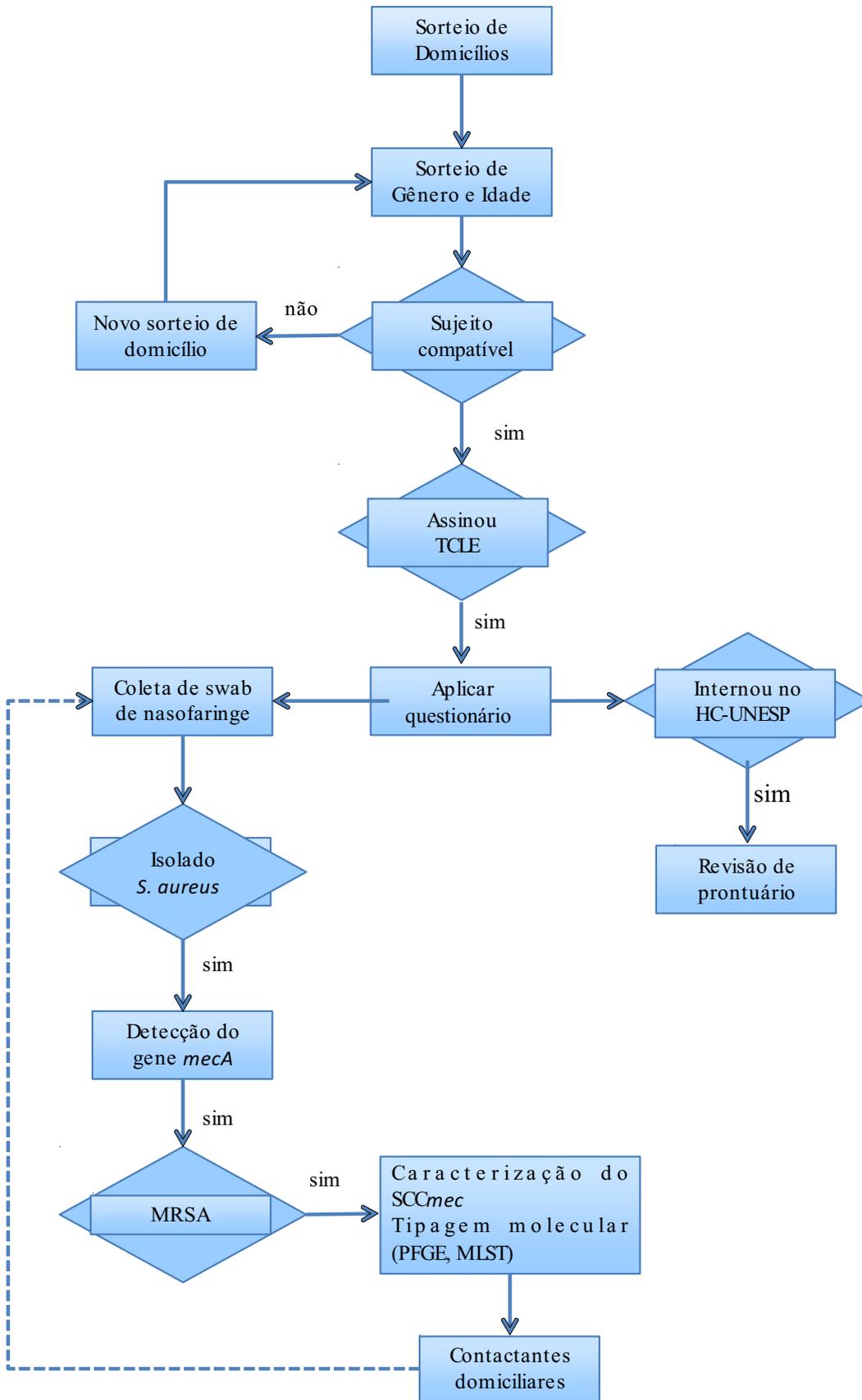
O amplificado de cada gene foi purificado com kit específico e preparado para a realização de sequenciamento das duas fitas (senso e antisenso).

A análise foi a partir da fita consenso com o banco de dados encontrado no site <http://saureus.mlst.net/>

12. Análise estatística dos resultados

Foram aplicados os procedimentos rotineiros para análise de estudos de delineamento transversal. As análises diferiram quanto ao desfecho: carreamento de *S. aureus*, carreamento de MRSA e mesmo carreamento de isolados de determinados clones ou com perfis genômicos específicos. Foram considerados possíveis fatores de risco os dados demográficos, escolaridade, renda familiar, co-morbidades referidas, práticas esportivas, internações (e outros contatos com serviços de saúde) e uso de antimicrobianos. Os dados foram submetidos a análises univariadas e multivariadas (por regressão logística).⁷⁴ Na primeira fase (univariada), foram utilizados os testes do Chi-quadrado ou Exato de Fisher para variáveis dicotômicas e T de Student ou U de Mann-Whitney para variáveis contínuas. Para a análise multivariada foram construídos modelos de regressão logística, com inserção gradual de variáveis (*forward selection*). Os critérios de entrada e permanência nos modelos foram p-valores inferiores a 0,05 e 0,1, respectivamente. O p-valor final abaixo de 0,05 foi utilizado como limite de significância.

13. Fluxograma da pesquisa



Algumas observações sobre o fluxograma devem ser feitas:

- O teste de resistência a meticilina/oxacilina considerado “padrão-ouro” foi a identificação do gene *mecA* por PCR. No entanto, testes de difusão em disco com Cefoxitina e Oxacilina foram realizados concomitantemente.
- Os sujeitos “primários” (ou seja, identificados na primeira busca), positivos ou não para *S. aureus* ou MRSA, foram submetidos às análises estatísticas. Os sujeitos “secundários” (identificados em busca de contactantes domiciliares de colonizados por MRSA) não foram incluídos nessa análise.

14. Questões éticas

- *Autonomia e confidencialidade*: Os sujeitos foram incluídos na pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, **anexo 1**). Para os sujeitos menores de 18 anos, foi solicitada a assinatura do responsável legal. No entanto, para aqueles com 12 anos ou mais, foi também obtido o seu consentimento assinado. A total confidencialidade dos dados foi garantida a todos os sujeitos, bem como a possibilidade de retirar-se da pesquisa se achar conveniente.
 - *Riscos*: A coleta de *swab* de orofaringe é um procedimento não invasivo, que causa mínimo desconforto. Esse procedimento foi realizado por enfermeira capacitada. Assim sendo, os riscos para os sujeitos da pesquisa foram ínfimos.
 - *Benefícios individuais*: a colonização nasal por *S. aureus* é um fenômeno comum e não acarreta em si riscos significativos aos pacientes. Procedimentos de descolonização não são indicados para esse grupo. No entanto, indivíduos colonizados que apresentem infecções de repetição em pele (ou outros sítios)
-

podem beneficiar-se da descolonização.⁶⁸ Sujeitos nessas condições foram submetidos a descolonização com Mupirocina nasal (duas vezes ao dia por cinco dias). Embora o benefício da descolonização para carreadores de CA-MRSA não esteja claro,⁷¹ esse procedimento foi também oferecido para sujeitos classificados nesse grupo.

- *Benefícios indiretos:* Este estudo teve grande importância para o mapeamento dos carreadores de *S. aureus* na comunidade. Além disso, a identificação de indivíduos colonizados por MRSA pode embasar estratégias preventivas e ter potencial implicação sobre protocolos terapêuticos.
-

Resultados

RESULTADOS

1. Prevalência encontrada de *S.aureus* e MRSA na população geral do estudo

Ao todo, foram realizados 686 *Swabs* nasais. *S. aureus* e MRSA foram identificados em 32,7% (IC95%=29,2%-36,2%) e 0,9% (IC95%=0,4%-1,8%), respectivamente (**Figura 1**).

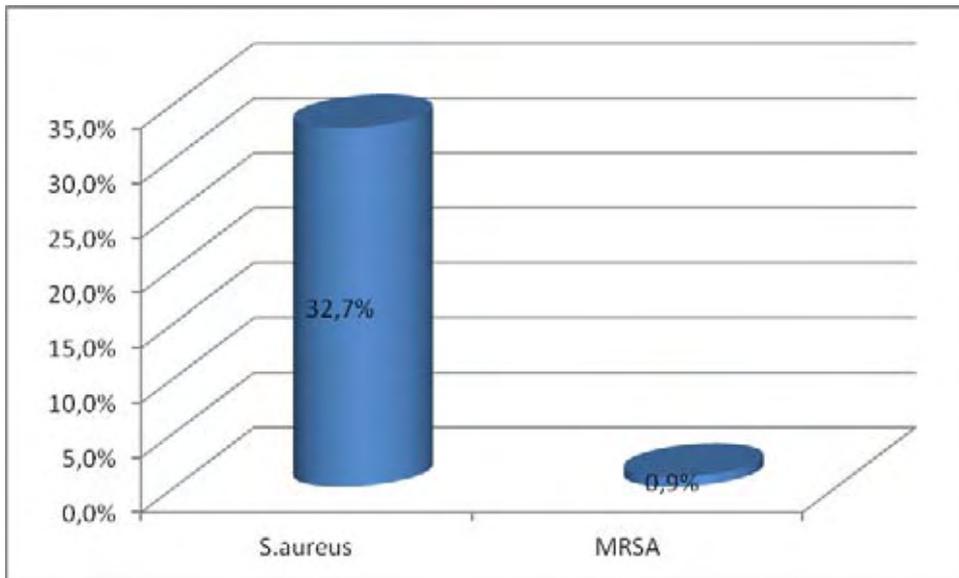


Figura1: Prevalência de colonização nasal de *S.aureus* e MRSA na população estudada.

1.2 Prevalência de MRSA nos contactantes

Foram avaliados 15 contactantes de sujeitos positivos para MRSA e encontrados dois colonizados por esse agente. A prevalência entre esses contactantes foi, portanto, de 13,3% (IC95%=2,3-35,5). Em relação à população geral do estudo, esse resultado foi significativamente superior: RR=15,24 (IC95%=3,34-69,44; p=0,02).

2. Fatores de risco para colonização nasal por *S. aureus* e MRSA

Os fatores de risco para colonização nasal por *S. aureus* e MRSA identificados em análise univariada são apresentados nas **Tabelas 3 e 4**. Na análise multivariada, a história de infecção de pele recente e o gênero masculino foram fatores de risco para colonização de *S. aureus*. Por outro lado, as idades dos sujeitos foram um fator de proteção. A análise multivariada mostrou que a colonização de MRSA se associava positivamente à presença de infecção de pele recente. O resultado dos modelos multivariados finais são mostrados na **Tabela 3**.

3. Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas “*in vitro*”- Técnica da difusão da droga

Para avaliação da resistência à Meticilina, foram testadas para as 224 amostras de *S. aureus* o teste de suscetibilidade obtido através da técnica de disco- difusão e as drogas empregadas foram: Oxacilina (1 ug) e Cefoxitina (30 ug). As medidas dos halos de inibição para análise do perfil de resistência são: \geq a 22 mm é sensível e para ser resistente apresenta halo \leq 21 mm para o disco de Cefoxitina e para o disco de Oxacilina \geq 12 mm sensível e \leq 10 mm resistente, critérios recomendados pelo CLSI⁷⁰.

Dentre os sujeitos (e contactantes) identificados como portadores de MRSA pelos testes moleculares (ver adiante), as amostras 103,106, 251, 341 foram sensíveis a Oxacilina e os isolados 610 e 661 foram resistentes. Para Cefoxitina as amostra 103, 106, 251, 610 e 661 foram resistentes e o isolado 341 foi sensível. A amostra 341 que apresentou-se sensível aos discos de antibióticos, no teste genotípico apresentou o gene

mecA . O contactante do 251 demonstrou resistência aos dois antibióticos já o 610 contactante apresentou-se sensível à Cefoxitina e resistente à Oxacilina. (**Quadro 4**).

Quadro 4. Resultados dos testes fenotípicos para resistência à oxacilina e cefoxitina (medidas dos halos dos testes de difusão em disco).

Amostras MRSA	Disco - Oxacilina	Disco - Cefoxitina
103	19 mm	11 mm
106	16 mm	13 mm
251	14 mm	13 mm
25-C*	0 mm	13 mm
341	15 mm	26 mm
610	6 mm	15 mm
610-C*	15 mm	18 mm
661	0 mm	12 mm

C*= Contactantes

3.1 Detecção do gene *mecA* de resistência para meticilina

Das 686 isolados foram encontradas 223 amostras de *S. aureus* e dessas 06 amostras foram encontrados à presença do gene *mecA* e em mais dois contactantes que são mostrados na **Figura 2**.

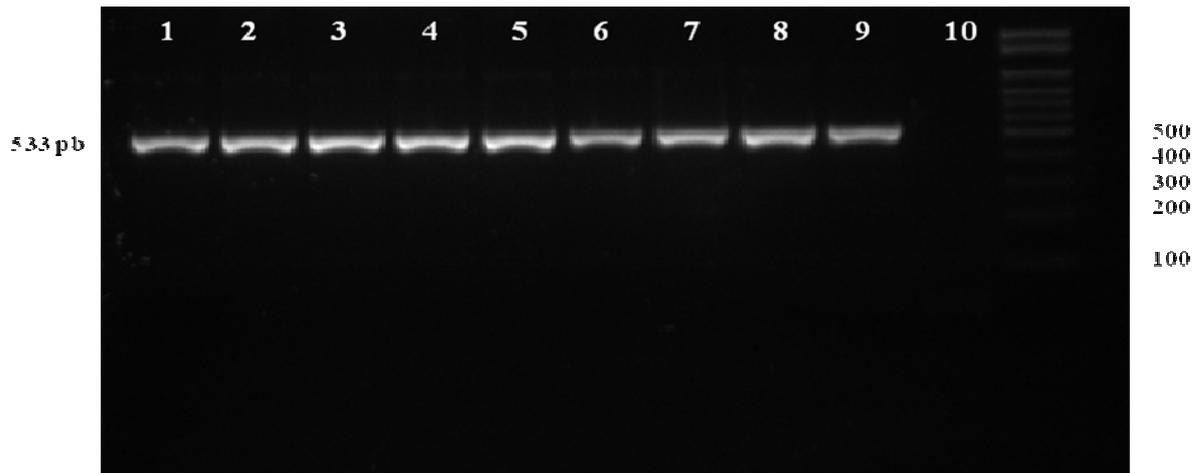


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de *S. aureus*, *mecA* positivas, poços 1 a 8, sendo 7 e 8 contactantes, controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) poço 9 e controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923) poço 10.

3.2 Determinação do tipo de SCCmec

Das 223 amostras identificadas como *S. aureus* de colonização nasal todos os 06 isolados identificados como MRSA apresentaram SCCmec tipo IV, como são mostrados na **Figura 3**.

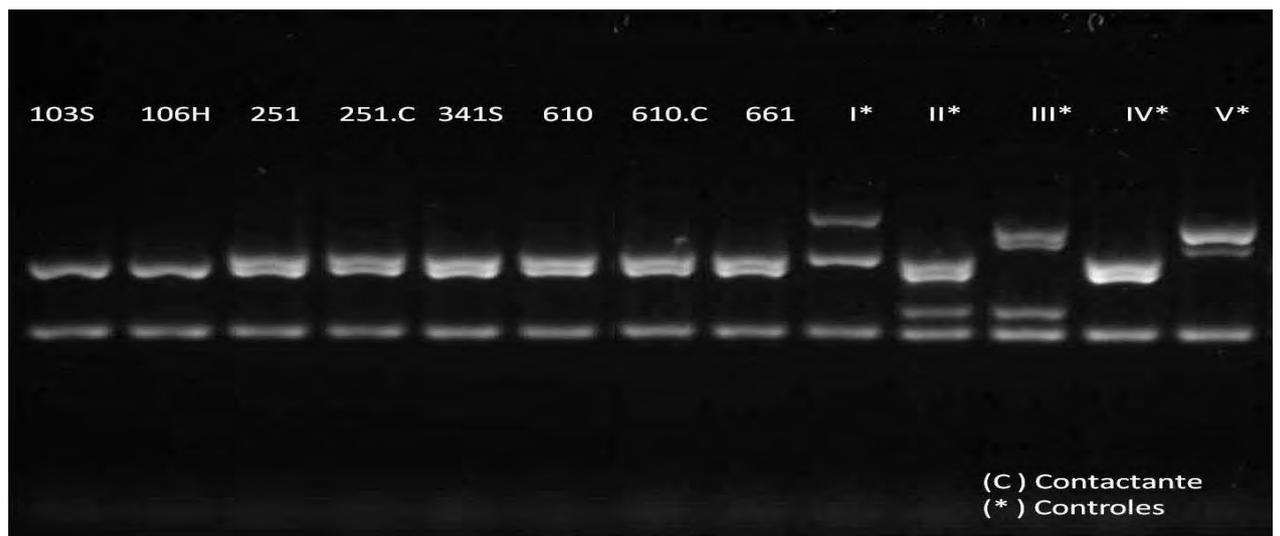


Figura 3 : Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando produtos amplificados do SCCmec em *S. aureus*. Cepas controle, I*: COL, II*: PER34, III*: AN546, IV*: MW2 .Todas apresentaram SCCmec Tipo IV

3.3 Identificação clonal dos MRSA

Foi realizado PFGE das 06 amostras de MRSA e dos dois contactantes para identificação clonal. Identificamos dois clusters domiciliares com 100% de similaridade das amostras 610 e 610 contactante e das amostras 251 e seu contactante. Encontramos um *cluter* em um mesmo setor censitário com similaridade de 100% das amostras 103 e 106. Com exceção da amostra 341 que se agrupou com um clone controle EMRSA15 disseminado mundialmente, as demais amostras se agruparam por apresentarem mais de 80% de similaridade, formando um único agrupamento clonal, conforme são demonstrados na **Figura 4**.

3.4 Tipagem molecular de MRSA por MLST

Dos 06 isolados de MRSA, as amostras 103,106, 251 e seu contactante e 661 apresentaram o tipo sequencial ST5 e os isolados 341, 610 e seu contactante expuseram tipo sequencial ST 1176. Ambos os sequenciamento da linhagem CC5. (**Figura 4**).

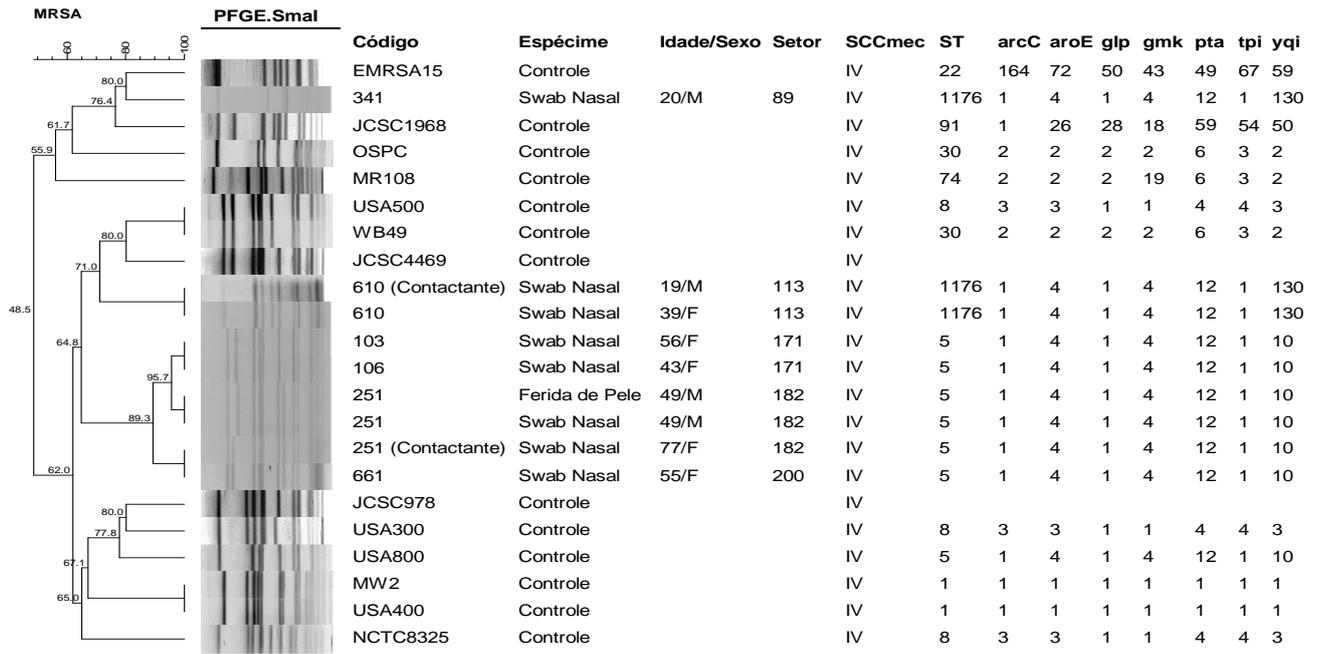


Figura 4. Dendrograma (Bionumres) gerado pelo método UPGMA , mostrando agrupamento clonal e tipo sequencial das amostras de MRSA do estudo e comparação com diversos controles (isolados carreadores de SCCmec IV de diversos países).

Tabela 1. Resultados de análise univariada de fatores de risco para colonização nasal de *Staphylococcus aureus* nos sujeitos da pesquisa.

Fatores de Risco	Casos (n=224)	Controles (n=457)	OR (IC95%)	p
<i>Dados demográficos</i>				
Gênero Masculino	119 (53,3)	185 (40,0)	1,70 (1,23-2,34)	0,001*
Idade (Média, Variação)	28,1 (1-90)	36,3 (1-87)	...	<0,001*
Estudante	94 (42,0)	130 (28,2)	1,84 (1,32-2,57)	<0,001*
Escolaridade inferior a "Fundamental Completo"	106 (47,3)	187 (41,3)	1,23 (0,93-1,76)	0,13
Trabalha	74 (33,0)	178 (38,5)	0,79 (0,56-1,10)	0,16
Renda familiar (mediana, variação/Reais)	1.600 (400-12.000)	1.500 (350-16.000)	...	0,92
Frequenta creche	16 (7,1)	22 (4,8)	1,84 (0,79-2,99)	0,02*
Serviço militar	0 (0,0)	1 (0,2)	0,0 (...)	1,00
Cadeia ou presídio	0 (0,0)	1 (0,2)	0,0 (...)	1,00
Casa de repouso	1 (0,4)	1 (0,2)	2,07 (0,13-33,20)	0,55
<i>Comportamento</i>				
Tabagismo	20 (8,9)	56 (12,3)	0,71 (0,42-1,22)	0,21
Etilismo	30 (13,4)	64 (13,9)	0,96 (0,60-1,53)	0,87
Drogas inalatórias	0	1 (0,2)	0,0 (...)	1,00
Drogas endovenosas	0 (0,0)	2 (0,4)	0,0 (...)	1,00
Prática de esportes	61 (27,2)	86 (18,6)	1,64 (1,12-2,38)	0,01*
Uso de brincos	76 (33,9)	206 (44,6)	0,64 (0,46-0,89)	0,008*
<i>Piercing</i>	7 (3,1)	24 (5,2)	0,59 (0,25-1,38)	0,22
Tatuagem	18 (8,0)	47 (10,2)	0,77 (0,44-1,36)	0,37
<i>Comorbidades e outras informações de saúde</i>				
Doença cardíaca	5 (2,2)	15 (3,2)		
Doença pulmonar	14 (6,3)	17 (3,7)	1,75 (0,84-3,61)	0,13
Doença renal	0 (0,0)	3 (0,6)	0,0 (...)	0,23
Doença do Sistema Nervoso Central	5 (2,2)	13 (2,8)	0,79 (0,28-2,24)	0,66
Diabetes mellitus	4 (1,8)	13 (2,8)	0,35 (0,12-0,95)	0,04*
Neoplasia	2 (0,4)	5 (1,1)	0,83 (0,16-3,30)	1,0
Úlcera de decúbito	2 (0,4)	9 (1,9)	0,45 (0,10-2,12)	1,0
Infecção de pele recente	25 (11,2)	27 (5,8)	2,02 (1,15-3,56)	0,01
Pneumonia recente	3 (1,3)	11 (2,4)	0,56 (0,15-2,02)	0,57
Uso recente de antimicrobianos	56 (25,0)	93 (20,1)	1,32 (0,91-1,93)	0,15
Uso recente de esteróides	4 (1,8)	6 (1,3)	1,38 (0,39-4,95)	0,74
Internação recente	14 (6,3)	20 (4,3)	1,47 (0,73-2,97)	0,28
Cirurgia recente	8 (3,6)	13 (2,8)	1,28 (0,52-3,13)	0,59

Dados em número (%), exceto quando especificado. OR, Odds Ratio; IC Intervalo de Confiança.*Dados estatisticamente significantes.

Tabela 2. Resultados de análise univariada de fatores de risco para colonização nasal por MRSA nos sujeitos da pesquisa.

Fatores de Risco	Casos (n=6)	Controles (n=680)	OR (IC95%)	p
<i>Dados demográficos</i>				
Gênero Masculino	3 (50,0)	301 (44,3)	1,26 (0,25-6,27)	1,00
Idade (Média, Variação)	43,7 (20-56)	33,3 (1-90)	...	0,26
Estudante	1 (16,7)	226 (32,9)	0,41 (0,05-3,51)	0,67
Escolaridade inferior a "Fundamental Completo"	1 (16,7)	312 (45,9)	0,25 (0,01-1,81)	0,34
Trabalha	4 (66,7)	248 (36,5)	3,48 (0,63-19,11)	0,2
Renda familiar (mediana, variação/Reais)	600-5.000	350-16.000	...	0,98
Frequenta creche	0 (0,0)	38 (5,6)	0,0 (...)	1,00
Serviço militar	0 (0,0)	1 (0,1)	0,0 (...)	1,00
Cadeia ou presídio	0 (0,0)	1 (0,1)	0,0 (...)	1,00
Casa de repouso	0 (0,0)	2 (0,3)	0,0 (...)	1,00
<i>Comportamento</i>				
Tabagismo	0 (0,0)	76 (11,2)	0,0 (...)	1,00
Etilismo	0 (0,0)	94 (13,8)	0,0 (...)	1,00
Drogas inalatórias	0 (0,0)	1 (0,1)	0,0 (...)	1,00
Drogas endovenosas	0 (0,0)	2 (0,3)	0,0 (...)	1,00
<i>Prática de esportes</i>				
Uso de brincos	0 (0,0)	281 (41,4)	0,0 (...)	0,09
"Piercing"	0 (0,0)	31 (4,6)	0,0 (...)	1,00
Tatuagem	0 (0,0)	65 (9,6)	0,0 (...)	1,00
<i>Comorbidades e outras informações de saúde</i>				
Doença cardíaca	0 (0,0)	20 (2,9)	0,0 (...)	1,00
Doença pulmonar	1 (16,7)	29 (4,3)	4,48 (0,51-3,62)	0,24
Doença renal	0 (0,0)	3 (0,4)	0,0 (...)	1,00
Doença do Sistema Nervoso Central	0 (0,0)	18 (2,7)	0,0 (...)	1,00
Diabetes mellitus	0 (0,0)	27 (4,0)	0,0 (...)	1,00
Neoplasia	0 (0,0)	11 (1,6)	0,0 (...)	1,00
Úlcera crônica	0 (0,0)	1 (0,1)	0,0 (...)	1,00
Infecção de pele recente	2 (33,3)	50 (7,4)	6,25 (0,78-36,12)	0,07
Pneumonia recente	0 (0,0)	14 (2,1)	0,0 (...)	1,00
Uso recente de antimicrobianos	2 (33,3)	147 (21,6)	1,81 (0,33-10,00)	0,62
Uso recente de esteróides	0 (0,0)	10 (1,5)	0,0 (...)	1,00
Internação recente	0 (0,0)	34 (5,0)	0,0 (...)	1,00
Cirurgia recente	0 (0,0)	21 (3,1)	0,0 (...)	1,00

Dados em número (%), exceto quando especificado. OR, Odds Ratio; IC Intervalo de Confiança.

Tabela 3. Resultado de análise multivariada de fatores de risco para colonização nasal *Staphylococcus aureus* e MRSA nos sujeitos da pesquisa.

Fatores de risco	OR (IC95%)	p
<i>Saphylococcus aureus</i>		
Gênero masculino	1,57 (1,13-2,15)	0,008
Idade	0,98 (0,97-0,99)	<0,001
Infecção de pele recente	1,97 (1,09-3,54)	0,02
<i>MRSA</i>		
Infecção de pele recente	9,64 (1,60-57,97)	0,01

MRSA Meticilin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina).OR,Odds Ratio; IC, Intervalo de Confiança.



Discussão

DISCUSSÃO

A emergência de linhagens *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina de origem comunitária (CA-MRSA) pôs em foco as lacunas no conhecimento de reservatórios populacionais e da dinâmica de transmissão desse agente em diferentes comunidades ou população sadias. Essas lacunas são mais extensas nos países em desenvolvimento. No Brasil, até o momento não foram descritos resultados de inquéritos de base populacional sobre carreamento de *S. aureus* e MRSA.

Nosso trabalho visa preencher esse espaço, fornecendo dados para embasar condutas clínicas e em saúde pública. Nesse sentido, os resultados tem impressionante semelhança com os reportados no inquérito norte-americano do NHANES.^{45,46,47} Os resultados apresentados por esse inquérito de prevalência de carreamento foi de 32,4% para *S. aureus* e 0,8% para MRSA, e os nossos achados de prevalência de carreamento de *S. aureus* foi de 32,7 % e 0,9 % para MRSA.

Pesquisando vários estudos sobre colonização nasal por *S. aureus* e MRSA em outras regiões do mundo, verificamos que, embora tenham focado em colonização nasal, a grande maioria refere-se a pacientes internados ou grupos especiais, como profissionais de saúde, acadêmicos de enfermagem, de medicina, atletas e trabalhos analisando carreamento na admissão hospitalar, ou seja, grupos específicos. Poucos inquéritos de base populacional são relatados.

Goudn *et al.*⁷⁵ realizaram um estudo em Bangalore no Sul da Índia de base-populacional em 1000 voluntários de diferentes estratos socioeconômicos e faixas etárias. Nesse estudo, encontraram na classe social mais elevada carreamento nasal de 61 % *S.aureus* e 18,8% MRSA, classe média 29% de *S. aureus* e 12,5% para MRSA e

para classe mais baixa 32% *S. aureus* e 17,7% para MRSA. As prevalências encontradas nesse inquérito das classes sociais média e baixa apresentam uma semelhança aos nossos resultados de carreamento de *S. aureus* em geral. No entanto, a alta prevalência de MRSA relatada por aqueles autores é um fenômeno impressionante. Ressalte-se que o estudo não explica como foram selecionados os sujeitos de pesquisa.

Um estudo de base-populacional realizado no estado de Queensland, na Austrália, Munckhof et al.⁷⁶ encontraram em 396 voluntários na população adulta de dois subúrbios da cidade de Brisbane e mais 303 selecionados aleatoriamente do cartório eleitoral desse mesmo local, uma prevalência de 28% de *S. aureus* em carreamento nasal e 0,7% para MRSA, outro resultado que corrobora com os nossos achados de prevalência de MRSA.

Malik et al.⁷⁷ analisaram 490 voluntários de um prédio público e uma creche em Nova Orleans, EUA. Foram coletadas amostras nasais de 259 voluntários de ambos, onde houve prevalência de 1% de MRSA.

Nguyen et al.⁷⁸ relatam a eclosão de MRSA associados à comunidade de um time de futebol universitário na cidade de Atlanta, EUA onde foram obtidos 99 culturas nasais dos seus membros 26% colonizados com *S.aureus* e oito 8% era MRSA. Demonstrando uma prevalência que condiz ao nosso trabalho a relação de *S.aureus* encontrado, mesmo apresentando uma diferença nos valores de MRSA. Hamdan-Partida et al.³⁵ analisando a caracterização e persistência de isolados de carreamento nasal e garganta de voluntários de uma comunidade do México, encontraram 165(22.2%), de 1234 voluntários, colonizados por *S. aureus*. Em MRSA, 106(8,6%) do mesmo grupo de voluntários. Du et al.⁷⁹ coletaram amostras nasais de 935 voluntários do campus de uma faculdade de Medicina em Wenzhou, Sudeste da China ,

acharam prevalência de 144(15,4%) para *S.aureus* e para MRSA 28(3%). Jerningan et al.⁸⁰ realizaram cultura nasal de 973 pacientes nas primeiras 48 horas de admissão, obtiveram, uma prevalência de 205(21%) *S. aureus* e 26 (2,7%) MRSA. As pesquisas citadas neste parágrafo selecionaram de forma variadas a população de estudo. Nenhuma delas utilizou amostragem de base populacional. Dessa forma, vieses de seleção podem explicar a prevalência mais elevada de MRSA.

Esses dados indicam que a colonização por MRSA varia significativamente, mesmo dentro de populações em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Faz-se necessário detectar e monitorar essas cepas na comunidade, e no hospital, para melhor entendimento da epidemiologia e do controle dessa disseminação.

Como ressaltamos anteriormente, os relatos de CA-MRSA no Brasil são escassos, e principalmente representados por relatos de casos clínicos de infecção por esse agente.

Em nosso estudo foram encontrados seis carreadores com CA-MRSA todos SCCmec tipo IV. Nenhum havia tido contato com serviço de saúde. De acordo com a literatura há relação entre carreamento de MRSA e infecções de pele e tecidos moles, sustentando nossos achados. Ressalte-se que dois dos carreadores CA-MRSA relatavam infecções de pele – um fator de risco independente para colonização na nossa análise multivariada. Vale salientar que um dos sujeitos da nossa pesquisa colonizado com CA-MRSA tipo IV, apresentava uma ferida de pele no momento em que coletamos seu *Swab* nasal, e realizamos também o *Swab* da mesma. Encontramos 100% de similaridade entre as cepas (**Figura 4**), simultaneidade entre a colonização e infecção.

Pereira et al.⁸¹ estudaram isolados de feridas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu, encontraram, CA-MRSA carreador de SCCmec

tipo IV. De forma similar, Bonesso et al.⁸² realizaram culturas em lesões de pele de pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, também com achado de MRSA com SCCmec IV.

Ribeiro et al.⁸³ em 2005 relataram os primeiros casos no Brasil de infecção por CA-MRSA. Eram dois pacientes procedentes da comunidade com infecções associadas a pele e tecidos moles, incluindo furúnculo e um outro com artrite séptica. Nenhum dos três apresentava critério para aquisição do MRSA em serviços de saúde.

O primeiro caso brasileiro de endocardite causada por CA-MRSA foi descrito em 2008 por Fortes et al.⁸⁴ Tratava-se de um paciente de 27 anos, previamente saudável com história de ferida de pele. Esse isolado foi caracterizado como SCCmec tipo IV. Rozenbaum et al.⁸⁵ relataram um caso clínico de uma criança de 10 anos com choque séptico com CA-MRSA, admitida em uma UTI pediátrica no hospital geral do Rio de Janeiro. Um caso de pneumonia necrotizante em um hospital escola na cidade de São Paulo foi descrito por Azevedo et al.⁸⁶ Neste, houve coleta de hemocultura em menos de 48 horas de admissão hospitalar. A paciente era previamente hígida quando iniciou o processo infeccioso. O isolado foi caracterizado como CA-MRSA tipo IV.

Esses relatos de caso confirmam a disseminação de CA-MRSA em nosso país e evidenciam a urgência de haver inquérito de base populacional para melhor entendermos sua disseminação. Faz-se necessário resaltar que a presença de MRSA adquirido na comunidade traz dilemas para intervenções preventivas e terapêuticas, embora a apresentação clínica inicial possa não diferir de outras infecções causada por estafilococos⁶⁰.

Um inquérito baseado em coleta de *swabs* nasais de pacientes em um Pronto Socorro na cidade de Brasília foi realizada por Ribeiro et al.⁸⁷ Os autores encontraram uma prevalência de 0,7% de carregamento de MRSA em 600 sujeitos incluídos. Em

somente um caso havia ausência de contato prévio com serviços de saúde, preenchendo-se, portanto os critérios epidemiológicos definidores de CA-MRSA.

A colonização nasal de acadêmicos de medicina de uma universidade em São Paulo foi estudada por Neves et al.⁸⁸. Estes obtiveram, em 240 alunos, 19,6% de prevalência de *S. aureus* e 10,8% de MRSA. Silva et al.⁸⁹, em um trabalho no estado de Pernambuco referente a colonização nasal de profissionais de saúde de unidades críticas de um hospital escola, evidenciou prevalência de 50 % de carreamento de *S.aureus* em técnicos de laboratórios e fisioterapeutas. Para o MRSA, a prevalência era de 3,3%. Naturalmente, os profissionais da saúde não são sujeitos representativos da comunidade em geral, já que podem adquirir a colonização no ambiente de trabalho.

Santos et al.⁹⁰ realizaram um estudo prospectivo para identificar a prevalência de MRSA em colonização nasal em pacientes internados em um hospital em Porto Alegre. No momento da admissão, havia colonização em 6,1% dos pacientes adultos e 2,3% no grupo infantil.

Esses trabalhos enfocam uma variedade de populações-alvo e resultados. Mas todas apontam para prevalência relevante de colonização por MRSA. Uma vez que esta é um importante fator de risco para infecções, pode-se inferir uma tendência à incidência crescente de quadros infecciosos por cepas de MRSA – o que evidencia sua importância em termos de saúde pública.⁸²

Na análise multivariada de nosso estudo, identificamos algumas características associadas ao maior risco de colonização por *S. aureus*: gênero masculino e infecção de pele recente. Outro achado interessante foi a idade ser inversamente associada à prevalência dessa colonização. Gorwitz et al.⁵¹ já haviam relatado que a presença desse patógeno na mucosa nasal dos homens é mais frequente que em mulheres (p=0,01) - o

que sugere que o gênero é relevante para colonização. Também demonstraram que portadores com menos de 20 anos de idade são colonizados com mais frequência, achado coerente nossos resultados.

Nesse mesmo contexto, Mertz et al.⁹¹ mostraram que colonização com *S. aureus* diminui à medida que as pessoas envelhecem. Esse alto risco em pessoas mais jovens é frequentemente relatado⁹⁵.

Um estudo realizado em soldados do Exército dos EUA, para avaliar a prevalência de colonização nasal identificou as infecções de pele recentes como um fator de risco para aquisição de *S. aureus* e MRSA⁹². Achado semelhante foi referido em pesquisa realizada em Atlanta, EUA. Nesta, aproximadamente dois terços das infecções causada por CA-MRSA estavam associadas a infecções de pele recente.⁹³ Tais achados fazem eco ao nosso estudo – no qual, apesar da pequena casuística de carreadores de MRSA, foi possível identificar esse fator de risco. Fica portanto evidente a importância dessas infecções como fator preditor para aquisição de MRSA.

Em nossa análise fenotípica para identificação do perfil de resistências das amostras de *S. aureus*, utilizamos o teste de suscetibilidade obtido através da técnica de disco-difusão. Obtivemos uma resistência maior para Cefoxitina em relação à Oxacilina.

O padrão de resistências dos microrganismos isolados na comunidade reflete a frequência com que os antibióticos são utilizados na prática clínica, tornando-se uma preocupação para saúde pública. Cepas de *S. aureus* sensíveis à Penicilina e Ampicilina são raras, tornando assim Oxacilina a droga de escolha. Atualmente cepas de MRSA já apresentam percentual de resistência variando de 80% a 100% em hospitais, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Frente a isso, infecções por MRSA vêm sendo tratada com glicopeptídeos como a Vancomicina. Um efeito indireto

do uso aumentado dos glicopeptídeos é a temida emergência de isolados com resistência parcial ou completa a essa classe de antibióticos¹⁰.

Em nosso estudo dos contactantes encontramos uma prevalência de 13,3% (2/15) de carreamento para MRSA, que possuem um pouco mais de 15 vezes mais chances de adquirir MRSA em relação à população geral do estudo. Além disso, observou-se a presença de disseminação intradomiciliar de um mesmo clone de MRSA tipo IV, visto que tanto os sujeitos quanto os contactantes apresentavam colonização por isolados com mais de 89,3% de similaridade.

Um estudo realizado no Alasca, EUA, por Stevens et al.⁹⁴, demonstrou que a presença de carreadores de MRSA entre membros da família aumenta o risco para infecções de pele entre os não carreadores desse agente. Mais uma vez, a literatura faz eco a nossos achados, que evidenciam a importância da disseminação intradomiciliar. Cabe ressaltar que essa informação pode ser útil para educação de pessoas identificadas como carreadoras de MRSA, para reforçar o valor das práticas de higienização das mãos, controle de fômites e outras medidas que têm sido recomendadas para evitar a disseminação desse patógeno dentro dos domicílios.

A epidemiologia molecular de *S. aureus* tem sido abordada por algumas técnicas, entre elas o MLST, que é um método essencial para determinar a origem dos isolados. Nessa análise, as determinações dos alelos de 07 genes constitutivos permitem a classificação em tipos sequenciais (*Sequence Types* - ST) que definem a origem evolutiva dos isolados e permitem o agrupamento dos STs relacionados em Complexos Clonais (CCs)⁹⁶. Inúmeros CCs já foram identificadas⁹⁷. Os CCs mais frequentes entre os isolados de MRSA pertencem a 06 linhagens: CC1, CC5, CC22, CC30 e CC45.⁹⁸

Das amostras isoladas em nosso inquérito, duas de sujeitos primários e uma de contactante foram caracterizadas como pertencentes ao clone ST1176. Os demais sujeitos e contactantes carregavam MRSA do clone ST5. Ambos os clones pertencem ao CC5. Ressalte-se que o ST1176 foi descrito por Carmo et al. em hemoculturas coletadas no Município de São Paulo.⁹⁸ O fato de ser este clone identificado em cidades com características distintas (São Paulo e Botucatu) sugere ampla disseminação do clone no Estado de São Paulo. É digno de nota que o CC5 agrupa diversos clones pandêmicos de CA-MRSA.

Gardella et al. demonstraram a predominância de ST5 em 69 isolados de pacientes sem história de colonização e com menos de 48 horas de admissão de seis centros de saúde das regiões leste e nordeste da Argentina. Esta predominância de isolados CA-MRSA ST5 entre pacientes em diferentes áreas geográficas sugere que esta cepa pode ter características genéticas que facilitem a disseminação na comunidade. De fato, ST5 é um das principais linhagens epidêmicas mundiais⁹⁹.

Quando nossos isolados foram tipados pela técnica de PFGE, foi possível identificar um agrupamento clonal bem disseminado com mais de 80% de similaridade. Uma das amostras (341) agrupou-se com 80% de similaridade com um clone descrito mundialmente, o EMRSA15.

Nosso estudo faz coro à literatura em apontar a disseminação de clones de MRSA na comunidade. Ainda que estes sejam minoritários entre as cepas de *S. aureus* que colonizam pessoas assintomáticas, sua presença não deve ser negligenciada. Ela deve ser levada em consideração no momento de decidir a terapia inicial de infecções presumivelmente estafilocócicas – embora não fique claro em que momento devemos

abandonar os beta-lactâmicos em favor dos glicopeptídeos ou outras classes com atividade contra CA-MRSA.

Talvez, no futuro, a definição de isolados de MRSA como comunitários não seja uma prioridade. A incorporação à rotina de técnicas moleculares que permitam rápido diagnóstico etiológico e – concomitantemente – informações sobre perfil de resistência e virulência poderá ter um impacto significativo sobre o prognóstico de infecções.

Até que isso seja possível, os estudos epidemiológicos são essenciais para fornecer informações que subsidiem ações de prevenção e controle – assim como para delineamento de diretrizes terapêuticas.

Conclusão

CONCLUSÃO

- A prevalência da colonização por *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu foi de 32,7%. Isolados resistentes à meticilina (MRSA) colonizavam 0,9% dessa mesma população. Esses resultados são semelhantes aos relatados em inquéritos de base populacional realizados nos Estados Unidos (NHANES).
 - Entre os fatores de risco para colonização por *S.aureus*, foram identificados o gênero masculino e a história de infecção recente de pele. Por outro lado, a idade dos sujeitos foi inversamente proporcional à prevalência dessa colonização.
 - Ao todo, seis sujeitos da pesquisa eram colonizados por MRSA. Todos os isolados eram carreadores do cassete cromossômico SCCmec do tipo IV, caracteristicamente associado a cepas de origem comunitária. Apesar do pequeno número de casos, a análise multivariada identificou infecção de pele como fator de risco independente para colonização por esse agente.
 - A análise molecular dos isolados de MRSA permitiu identificação de dois clones circulando no Município, ST5 e ST1176. Ambos pertencem ao Complexo Clonal 5, que agrupa grande parte das cepas pandêmicas. Deve-se ressaltar que o ST1176 foi descrito em isolados clínicos do município de São Paulo.
 - Dois sujeitos da pesquisa apresentavam contactantes domiciliares colonizados por MRSA do mesmo clone. Além disso, a maior parte dos isolados pertencem ao clone ST5 e dois sujeitos moradores da mesma região apresentam cepas com 100% de similaridade em *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. Em conjunto, esses achados apontam para a existência de agrupamentos domiciliares e regionais.
-

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

1. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. 1993; 259: 227-30.
2. Carvalho C, Pistelli IP, Mímica L, Cardoso MRA. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. J Pediatr. 2005; 81: 29-33.
3. Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EA. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? Braz J Infect Dis. 2005; 9: 70-6.
4. Shinefield HR, Ruff NL. Staphylococcal infection: a historic perspective. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23: 1-15.
5. Hecker M, Becher DM, Fuchs S, Engelmann S. A proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. 2010; 300: 76-87.
6. Chambers HF, De Leo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7: 629-41.
7. Velázquez-Meza ME. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. Salud Pública Mex. 2005; 47: 381-7.
8. Kluytmans AJ, Mouton WJW, IJzerman EPF, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Maat AWPM, Wagenvoort JHT, et al. Nasal carriage of *S. aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. J Infect Dis. 1995; 171: 216-9.
9. Yzerman EPF, Boelens HAM, Tjhie JHW, Kluytmans JAJ, Mouton JW, Verbrugh HA. DAPACHE II for predicting course and outcome of nosocomial *S. aureus* bacteremia and its relation to host defense. J Infect Dis. 1996; 173: 914-9.
10. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Fereria BLA, Afonso IF, Rodrigues CK, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43: 413-23.
11. Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus 1 *Staphylococcus*. 2011 [acesso 2011 dez 28]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.

12. Murray PM, Rosenthal K, Pfaller M. Medical microbiology. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2009.
13. Bannerman TL. Staphylococcus, micrococcus and other catalase-positive cocci that aerobically. In: Murray PR, editor. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. v.1, p.384-904.
14. Cavalcanti S, França ER, Cabral C, Vilela MA, Montenegro F, Menezes D, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. Braz J Infect Dis. 2005; 9: 56- 3.
15. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 7687-92.
16. Tacconelli E, Johnson PA. National guidelines for decolonization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carriers: the implications of recent experience in the Netherlands. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 2195-8.
17. Hu L, Umeda A, Kondo S, Amako K. Typing of *Staphylococcus aureus* colonising human nasal carriers by pulsed-field gel electrophoresis. J Med Microbiol. 1995; 42: 127-32.
18. Riewerts ENH, Espersen F, Rosdahl VT, Jensen K. Carriage *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. Epidemiol Infect. 1995; 115: 51-60.
19. Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, Farrington M, Fry C, Humphreys H, et al. Guidelines for the control and prevention of *meticillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. J Hosp Infect. 2006; 1: 1-44.
20. McGinagle KL, Gourlay ML, Buchanan IB. The use of active surveillance cultures in adult intensive care units to reduce *meticillin-resistant Staphylococcus aureus*-related morbidity, mortality, and costs: a systematic review. Clin Infect Dis. 2008; 46: 1717-25.
21. Ammerlaan HSM, Kluytmans JAJW, Berkhout H, Buiting A, De Brauwier EL, Van Der Broek PJ, et al. Eradication of carriage with *meticillin-resistant Staphylococcus aureus*: determinants of treatment failure. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 2418-24.
22. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. Infect Control Hosp Epidemiol. 1996; 17: 47-2.

-
23. Werthrin HF, Verveerv J, Boelens HA, van Belkun A, Verbrugh HA, Vos Mc. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1456-7.
 24. Chen CJ, Hsu KH, Lin TY, Hwang KP, Chen PY, Huang YC. Factors associated with nasal colonization of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2005; 49: 131-7.
 25. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 350-9.
 26. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J.* 2005; 35: 106-19.
 27. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300: 98-103.
 28. Kluytmans J, Belkum AV, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 505-20.
 29. Haires-de-Sousa GM, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* 2006; 368: 874-85.
 30. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic. *Nat Rev Microbiol.* 2009 ; 7: 629-41.
 31. Sperança PA, Gomes AS, Prazeres CMG. Sensibilidade dos *S. aureus* aos betalactâmicos e glicopeptídeos (“Estudo in vitro”). *Rev Cir Traumatol.* 2010; 10: 39-4.
 32. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 178-82.
 33. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2008 ; 16: 361-9.
 34. Gosbell IB. Epidemiology, clinical features and management of infections due to community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Intern Med J.* 2005; 35: 120-35.
-

-
35. Hamdan-Partida A, Sainz-Espunes T, Bustos-Martínez J. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a mexican community. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1701-5.
 36. Bassetti M, Nicco E, Mikulka M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? Int J Antimicrob Agents. 2009; 34: 15-9.
 37. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Br Med Bull. 2010; 94: 215-27.
 38. Köck R, Mellmann A, Schaumburg F, Friedrich WA, Kipp F, Becker K. The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. Dtsch Arztebl Int. 2011; 108: 761-7.
 39. Daurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggemann CA, Stobbering EE. The molecular evolution of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 222-35.
 40. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 4580-7.
 41. Kola A, Kirschner P, Gohrbandt B, Chaberny IF, Mattner F, Strüber M, et al. An infection with linezolid-resistant *S. aureus* in a patient with left ventricular assist system. Scand J Infect Dis. 2007; 39: 463-5.
 42. Boucher HW, Sakoulas G. Perspectives on Daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2007; 45: 601-8.
 43. Klevens RM, Morrison M, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763-71.
 44. 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: 720-6.
 45. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis. 2006; 193: 172-9.
-

-
46. Graham PL, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 318-25.
 47. Mainous AG, Hueston WJ, Everett CJ, Diaz VA. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *S. aureus* in the United States. 2001-2002. *Ann Fam Med.* 2006; 4: 132-7.
 48. Klevens RM, Morrison M, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* 2007; 298: 1763-71.
 49. 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: 720-6.
 50. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis.* 2006; 193: 172-9.
 51. 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.* 2008; 197: 1226-34.
 52. Furuya EY, Cook HA, Lee MH, Miller M, Larson E, Hyman S, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence: how common is it? A methodological comparison of prevalence ascertainment. *Am J Infect Control.* 2007; 35: 359-66.
 53. Abudu L, Blair I, Fraise A, Cheng KK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a community-based prevalence survey. *Epidemiol Infect.* 2001; 126: 351-6.
 54. Lu PL, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L, et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 132-9.
 55. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5: 200-14.
-

-
56. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis.* 2009; 13: 90-8.
 57. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5: 163-70.
 58. Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010; 14: 71-6.
 59. 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.* 2008; 14: 129-31.
 60. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1985-8.
 61. 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: 339-45.
 62. Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, dos Santos LC, 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.* 2009; 65:300-5.
 63. Reinert C, McCulloch JA, Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Type IV SCCmec found in decade old Brazilian MRSA isolates. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 213-36.
 64. Cesar CLG, Carandina L, Alves MCP, Barros MBA, Goldbaum M. Saúde e condição de vida em São Paulo. Inquérito multicêntrico de saúde no estado de São Paulo – ISA/SP. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2005.
 65. Ross, TD. Accurate confidence intervals for binomial proportion and Poisson rate estimation. *Comput Biol Med.* 2003; 33: 509-31.
-

-
66. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis.* 1987; 40: 373-83.
 67. Knaus WA, Draper EA, Wagner DR, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985; 13: 818-29.
 68. Konemman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.
 69. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - tenth edition (M02-A10). Wyne, PA: CLSI; 2009.
 70. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2240-4.
 71. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 3374-7.
 72. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5113-20.
 73. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1008-15.
 74. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health.* 1989; 79: 340-9.
 75. Goudn R, et al. Community prevalence of MRSA in southern India. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44: 309-12.
 76. Munckhof WJ, Nimmo RGJ, Schooneveldt MJ, Schlebusch SAJ, Stephens SAJ, Williams G, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 149-55.
-

-
77. Malik S, Vranken P, Silio P, Ratard R, Van Dyke R. Prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization outside the healthcare environment. *Epidemiol Infect.* 2009; 137: 1237-41.
 78. Nguyen DM, Mascola L, Bancroft E. Recurring methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in a football team. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 526-32.
 79. Du J, Chen C, Ding B, Tu J, Qin K, Parsons C, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of nasal staphylococcus aureus isolates from a Chinese Medical College Campus. *PLoS ONE* 2011; 6:1-5.
 80. Jernigan JA, Pullen AL, Partin C, Jarvis WR. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an outpatient clinic population. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24: 445-50.
 81. Pereira EPL. Caracterização da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de feridas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu, SP [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2011.
 82. Bonesso MF. Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana e *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2011.
 83. Fortes QS, Espanha CA, Bustorff FP, Zappa BC, Ferreira ALP, Moreira RB, et al. First reported case of infective endocarditis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* not associated with healthcare contact in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 541-3.
 84. Rozenbaum R, Sampaio MG, Batista GS, Garibaldi AM, Terra GMF, Souza MJ, et al. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 756-60.
 85. Azevedo AP, Inoue MF, Andrade SS, Tranches R, Pignatari CCA. Necrotizing pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42: 461-2.
 86. Ribeiro J, Boyce MJ, Zancanaro QR. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005; 91: 52-5.
-

-
87. Neves MA. Colonização das fossas nasais de acadêmicos de medicina por *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina, relacionada ao tempo de Exposição no ambiente hospitalar [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo; 2007.
 88. Silva ECBF, Antas MGC, Bezerra Neto AM, Rabelo MA, Melo FL, Maciel MAV. Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* in health care workers at a university hospital of Recife-PE. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 504-8.
 89. Santos BF, Machado PD, Camey AS, Kuchenbecker SR, Barth LF, Wagner BM. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 328-34.
 90. Mertz DR, Frei B, Jaussi A, Tietz C, Stebler U, Fluckinger, et al. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 475-7.
 91. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 647-56.
 92. Ellis M, Hospenthal D, Dooley D, Gray P, Murray C. Natural history of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 971-9.
 93. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 309-17.
 94. Stevens AM, Hennessy T, Baggett THC, Bruden D, Parks D, Klejka J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Carriage and Risk Factors for Skin Infections, Southwestern Alaska, USA. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 797-803.
 95. Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Hayakawa Y, Minagawa H. Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets. *J Appl Microbiol.* 2009; 107: 1367-74.
 96. Feng Y, Chin CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomic. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32: 23-37.
-

97. Cokfield J, Pathak S, Edgeworth JD, Lindosay JA. Rapid determination of HA-MRSA *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 614-9.
 98. Carmo MS, Inoue F, Andrade SS, Paschoal L, Silva FM, Oliveira VGS, et al. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 10: 1013-7.
 99. Gardella N, Specht M, Cuirolo A, Rosato A, Gutkind G, Mollerach M. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62: 343-7.
-



Anexas

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 *Saphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular.” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessário.

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 sua mucosa nasal 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.

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 pessoalmente através dos pesquisadores, que voltarão a visitar sua casa. Caso você tenha o “estafilococo” resistente ou venha apresentando várias infecções de pele, será encaminhado para atendimento no Hospital das Clínicas da Unesp. Lá, nós forneceremos uma “pomada” nasal e um sabão líquido com antisséptico para eliminação do “estafilococo”. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, 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 a esse questionário. Caso você tenha sido internado no hospital das clínicas da UNESP no último ano, solicitamos sua autorização para coletar dados do seu prontuário.

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 a 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: 14-3811 6143).

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: _____

Pesquisadores:

Fabiana Venegas Pires – Fone: (14) 9151 1577

Carlos Magno C. B. Fortaleza – Fone (14) 9601 0996

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N - Anexo vermelho – 3º Andar.

Fone: (14) 3811 6212

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu Fone: (14)
3811 6143

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 *Saphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular.” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessário.

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 da mucosa nasal 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.

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 pessoalmente através dos pesquisadores, que voltarão a visitar sua casa. Caso seu[sua] filho[a] (ou dependente) tenha o “estafilococo” resistente ou venha apresentando várias infecções de pele, será encaminhado para atendimento no Hospital das Clínicas da Unesp. Lá, nós forneceremos uma “pomada” nasal e um sabão líquido com antisséptico para eliminação do “estafilococo”. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, 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 ao questionário. Caso seu filho [sua filha] ou dependente tenha sido internado no hospital das clínicas da UNESP no último ano, solicitamos sua autorização para coletar dados do prontuário.

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 a 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: 14-3811 6143).

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: _____

Pesquisadores:

Fabiana Venegas Pires – Fone: (14) 9151 1577

Carlos Magno C. B. Fortaleza – Fone (14) 9601 0996

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N - Anexo vermelho – 3º Andar.

Fone: (14) 3811 6212

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu Fone: (14) 3811 6143

Anexo 2 – Questionário a ser aplicado aos sujeitos da pesquisa no momento da coleta dos swabs.**Dados gerais:**

Nome: _____ Data Nascimento: __/__/____

Idade: _____ Gênero: __ Profissão: _____

Escolaridade: _____ Renda familiar aproximada: _____

Se estudante (inclusive universitário):

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

Se trabalha:

Local de trabalho: _____

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

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? _____
- () Esteróide. Qual? _____. Quando? _____
- () Outra(s) medicação(ões). Qual(is)?: _____
_____. Quando? _____

Internação e outros procedimentos no último ano:

- () Internação. HC-UNESP? () S () N. Quando? _____

Prontuário: _____

- () 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 freqüentou no último ano:

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

() Outra. Qual? _____

Outras observações do sujeito: _____

Anexo 3 – Ficha para levantamento de dados em prontuário.

Nome: _____ Sexo _____

Idade: _____ Prontuário: _____

Enfermaria: _____

Diagnóstico principal: _____ CID _____

Co-morbidades/Charlson score

1 - () IAM () ICC () Doença vascular periférica
 () Demência () DPOC () Doença do tecido conjuntivo
 () úlcera péptica () Hepatopatia leve
 () Doença cerebrovascular () Diabetes

2 - () Hemiplegia () Doença renal moderada/severa
 () Neoplasia maligna () Leucemia () Linfoma
 () Diabetes com dano de órgão

3 - () Doença hepática moderada/severa

6 - () AIDS () Tumor sólido metastático

Score de Charlson: _____

Outros scores disponíveis:

() APACHE II: _____ () PRISM: _____

Dados da internação

Admissão: no Hospital: ___/___/___; Dias no hospital: _____

Unidade: _____ Admissão: ___/___/___ Saída: ___/___/___

Unidade: _____ Admissão: ___/___/___ Saída: ___/___/___

Dados sobre imunidade

() Neutropenia:

() Esteróides:

() Imunossupressores

Procedimentos

() Cirurgias: _____ Data: ___/___/___

() Outros: _____ Data: ___/___/___

_____ Data: ___/___/___

Dispositivos invasivos

() Ventilador mecânico () CVC

() SVD () NPP

() Dreno(s): _____

Úlcera de Pressão? () S () N

Uso de Antimicrobianos

1. _____ de ___/___/___ a ___/___/___ total: ___ dias

2. _____ de ___/___/___ a ___/___/___ total: ___ dias

3. _____ de ___/___/___ a ___/___/___ total: ___ dias

4. _____ de ___/___/___ a ___/___/___ total: ___ dias

Cultura positiva para *S. aureus*? () S () N

***S. aureus* OXA-R? () S () N**

Material: _____ **Data:** ___/___/___

Outras culturas clínicas

Microorganismo: _____

Material: _____ Data: ___/___/___

Microorganismo: _____

Material: _____ Data: ___/___/___

Infecções Hospitalares? () S () N

Sítio: _____; Agente: _____

Data da detecção: ___/___/___

Sítio: _____; Agente: _____

Data da detecção: ___/___/___

Sítio: _____; Agente: _____

Data da detecção: ___/___/___
