UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Mariana Fávero Bonesso

Etiologia, Epidemiologia e Prognóstico das Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica em um Hospital de Ensino, com Ênfase no Estudo Molecular e Virulência de *Staphylococcus aureus*

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

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

Botucatu

Mariana Fávero Bonesso

Etiologia, Epidemiologia e Prognóstico das Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica em um Hospital de Ensino, com Ênfase no Estudo Molecular e Virulência de *Staphylococcus aureus*

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

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

Botucatu

2015

Leia se você é idealista. Se não for, leia também, talvez você se torne um!

Eu me pergunto se eu sou uma das pessoas mais sortudas/abençoadas por ter conseguido realizar grande parte dos meus sonhos até agora. Para fazer meus sonhos virarem realidade, paguei o preço por isso. Na verdade, muitas coisas desagradáveis aconteceram pelo caminho. Perdi algumas coisas que pensei que eras importantes, e agora percebo que foi a melhor lição. Sobre o preço que paguei para alcançar meus objetivos, posso dizer que perdi, mas eu ganhei muito mais de volta. Assim, a primeira lição: desapegue-se de conceitos, na maioria das vezes eles não são sues, foram aprendidos dos outros (o que tudo bem). Reinvente seus próprios conceitos, mas para isso (essa foi a forma como eu fiz, então não se prenda a minha forma ☺) você terá que se mover em direção aos seus objetivos. Seus objetivos são como uma bússola que guia você e suas ações, mas esteja disposto a enfrentar todas as coisas desagradáveis que virão. Porque elas virão.

Segunda lição aprendida: as pessoas vêm e vão. Não é porque eles foram embora eles não vão mais fazer parte da sua vida (Patrícia, Carlos, Eliane) e agradeço-lhes por me ensinar esta lição. Os mais próximos nunca vão deixá-lo sozinho (Ligia Abraão) e vão estar perto o suficiente para compartilhar a viagem tornando-a mais especial. Alguns amigos (Luiza, Danilo, Thaís, Katheryne) farão você sentir a sua amizade e apoio, mesmo não estando tão perto. Algumas pessoas, pessoas muito especiais, irão sempre inspirar e apoiá-lo incondicionalmente, e eu posso dizer que eu fui abençoada com uma família onde eu encontro apoio e perseverança (mãe, Marcia), força e foco (pai, Allaymer), alegria e inspiração (Ligia e Ronaldo, irmãos), paz e companheirismo (avó, Lourdes), compreensão (Tios Sergio e Estela). Algumas pessoas vão entrar em sua vida (Alexandre) trazendo mais pessoas (Itaile, Claudio, Eliana, Fabio) para enriquecer os momentos, e mesmo mudando de status, a amizade que permanece é preciosa. Então, chega o momento de alcançar o objetivo (e sim esse momento chega!) meus verdadeiros amigos permaneceram lá, torcendo e apoiando à distância, e apesar das minhas preocupações, eles não me substituíram. É difícil? Bem, existe alguma coisa fácil de alcançar? Tudo tem dois lados, e é isso que torna a jornada interessante. Ir para outro país com um "prazo de validade" mudou minha maneira de enxergar a vida: cada momento é único, finito e especial o que me fez desfrutar de cada dia como se eu nunca fosse ter o outro dia igual aquele novamente. Terceira lição aprendida: aproveitar a minha vida como único, finito e especial, porque vamos ser honestos aqui, nós realmente não sabemos quando vai ser o nosso último dia. Parafraseando Steve Jobs: se vivermos cada dia como se fosse o último, um dia nós estaremos certos. Bem isso está ficando muito longo, mas eu prometo que vale a pena continuar a leitura!

Outro capítulo da minha vida: doutorado sanduiche no NIH - Eu nunca pensei que seria tão *great*. Quando cheguei nos EUA a primeira pessoa que conheci tornou-se um irmão da Malásia (Yang) que eu admiro profundamente e considero tanto, ele sempre me apoiou e ainda me apoia. Então, quando eu conheci os meus colegas de trabalho, a primeira pergunta foi: você joga videogame? (Amer e Trung) me senti segura e acolhida porque estava em meio a pessoas que conheço bem: nerds. Além disso, eu encontrei um outro irmão (Amer) que me ajudou de muitas maneiras e me ensinou a palavra DB (vamos manter assim). Para alguns

amigos (Trung) nosso contato foi tão breve, mas foi tão significativa, tornando-se meu amigo com quem posso falar vários assuntos desde desenhos até OVNIs! Outros amigos (Katheryne Le) estarão lá não só para apoiar, mas também dar aquele empurrão para atingir os objetivos. Adquiri também uma irmã mais nova também cruzou o meu caminho (Yuanjun - Jane), mostrando que a ciência pode ser bonito e me ensinando lições de auto-confiança! Na ciência você deve ser inteligente e criativo (Sana), bem como de apoio: sempre vou lembrar das celebrações Persas e dos momentos especiais que participei junto à sua família! Lições da fé verdadeira, humildade e organização científica e algumas palavras coreanas (Howang Soo) ajudaram na minha evolução. Momentos de diversão e conversas agradáveis (Scott) aconteciam durante "Fro-Yo sessions". Instant-friend (Sarah) apareceu pouco antes de eu voltar, e como você sabe que é instantânea? Você provavelmente vai ao shopping fazer o seu cabelo de uma forma espontânea e sua vida nunca mais será a mesma. Nem o seu cabelo. Uma pessoa doce e care-bear (Tony Yeh) vai cuidar de você e buscar café com você para garantir um bom humor pela manhã! Alguns deles são tão sofisticados (Gordon) que vão te surpreender. E tudo isso só foi possível por causa de um e-mail que enviei e foi lido por um pesquisador que eu realmente admiro (Dr. Michael Otto); Eu sou tão grata por ele ter acreditado em mim como um cientista e me aceitado em seu laboratório, isso mudou a minha vida de tantas boas maneiras! Eu sei que ainda tenho um longo caminho a percorrer, mas este "sim" foi extremamente importante. Obviamente, o maior sim veio muito antes (Lurdinha), que proporcionou a maior mudança da minha vida, e por isso sou imensamente grata pela fé e pela oportunidade de me tornar uma doutora!

Você sabe, quando eu disse que a vida tira coisas que achamos que são importantes, mas no final, são apenas lições? Sim, para chegar a este ponto, você tem que perceber que é necessário mudar/evoluir conceitos. Foi nesse momento que eu finalmente entendi que tudo o que eu perdi tornaram-se lições e eu estava finalmente feliz com quem eu me tornei que Deus (eu chamo de Deus, porque eu sinto que é uma bênção em minha vida) trouxe uma pessoa especial (Joseph) em minha vida para eu cuidar e amar e me faz mais feliz do que eu jamais poderia imaginar que eu seria. Com ele, eu aprendi a para a quarta lição: somente quando você está feliz que você pode ser verdadeiramente feliz.

Assim, como você pode ver, a segunda lição que aprendi antes que tudo acontecesse ainda me serve, e me ajuda a permanecer em paz que tudo vai dar certo. Para mim a vida é assim: uma vez uma lição é aprendida, você vai aplica-la até que o momento que ela te serve. Quando não lhe serve mais, é hora de transformá-la como um alquimista transforma metais comuns em metais preciosos. Não tenha medo de mudar, tenha medo de permanecer imutável. O mundo está se movendo e as mudanças são inevitáveis de qualquer forma, então por que não para orientar essas mudanças na direção que você quer chegar?

Read this if you are Idealistic. If you are not, read it anyway, maybe you become one!

I wonder if I am one of the luckiest/blessed people in the world that could make most of my dreams come true (so far). Nothing was given me for free to make my dreams come true. In fact, I got many nasty things on my way. Lost some things I thought was important back then, which now I realize it was the best lesson. With that entire price that I payed to reach my goals, I can say I've lost but I gained so much more back. So the first lesson: detach from concepts, they are not yours and most of the time they came from others. Create your own concepts, but to create them you will have to move towards your goals. Your goals are like a compass guiding you and your actions but be willing to face all the nasty things that will come. Because they will. Second lesson learned: people come and go. It is not because they went away they will not be part of your life anymore (Patricia, Carlos, Eliane) and I thank them for teaching me this lesson. The closest ones will never leave you alone (Ligia Abraao) and will be close enough to share the trip making it more special. Some friends (Luiza, Danilo, Thais, Katheryne) can make you feel their friendship and support even not being so close. Some people, very special people, will inspire and support you no matter what, and I can say I was blessed with a family where I find support and perseverance (Mom, Marcia), strength and focus (Dad, Allaymer), joy and inspiration (Ligia and Ronaldo, siblings) unconditional love and peace and companionship (Grandma, Lourdes). I want you to know that some people will enter in your life (Alexandre) bringing more people (Itaile, Claudio, Eliana, Fabio) and keep adding more people enriching you life, and even if the status changed, the friendship that last is precious. So, when I reached my goal (Studying abroad in USA) all my friends (only the real ones) remained there, routing and helping me out by distance, and despite my concerns, they did not replaced me. Is it hard? Well, is there anything easy? Everything has both sides, and this is what makes everything interesting. Going to another country for a certain date and then come back feels like everything that has a period to end: each moment feels unique, finite and special making us to enjoy each day as if we would never have the another day like that again. Third lesson learned: enjoy my life as unique, finite and special, because lets be honest here, we actually do not know when it is going to be our last moment. Well this is getting long, but I promise it worth reading!

Another chapter of my life: a split PhD at NIH - I never thought it would be so great. When I arrived in USA the very first person I met became my *brother* from Malaysia (Yang) that I profoundly admire and care about, he was and still is always there for me. Then, when I first met my coworkers, they asked if I was a gamer (Amer and Trung) I felt I was in a familiar and safe place. In addition, I have found another brother (Amer) that helped me in so many ways and thought me the DB word (lets keep it this way). For some friends (Trung) our contact was so brief but was so meaningful, becoming my friend with whom I can talk several subjects since cartoons to UFOs! Other friends (Katheryne) they are there not only to support me, but also to give me that push to take the necessary steps toward your goals. A little sister also crossed my way (Yuanjun – Jane) showing that science can be pretty and teaching me self-confidence lessons! In science, you should be smart and creative (Sana) as

well as supportive: always remember the Persian celebrations I have been to and the special moments her family received me in their home! Lessons of true faith, humbleness and organization in science and some Korean words (Howang Soo) helped in my change to become a better person. Fun moments and nice conversation (Scott) happened over a bowl of Fro-Yo. There will be instant-friendship (Sarah) crossing your way, and how do you know it? You will probably go to the mall do your hair in a random way and your life will never be the same. Neither your hair. Sweet and care-bear person (Tony 3) will take care of you and get coffee to make sure you have a good mood in the morning! Some of them are so sophisticated (Gordon) that will blow your mind. And all of this was only possible because of an email I've sent and it was read by a researcher I truly admire (Dr. Michael Otto); I am so grateful he believed in me as a scientist and accepted me in his lab, it changed my life in so many good ways! I know I still have a long way to go, but this "yes" was extremely important! Obviously the biggest "yes" came way back (my supervisor Prof. Lurdinha) which changed my life and I am so grateful for the opportunity and faith in me, that now I will be a PhD!

You know when I said life take away things we think are important, but in the end, they were only lessons? Yea, to get at this point you have to realize you have to change concepts. It was in that moment I finally understood that all I have lost became lessons and I was finally happy with who I became. Then, God (I call God because I feel it is a blessing in my life) brought a special person (Joseph) into my life to care and love making me happier than I ever could imagine I would be. With him, I leaned the fourth lesson: only when you are happy that you can be truly happy.

Moreover, as you can see, the second lesson I learned before everything happened still serves me, and helps me to remain in peace that everything is going to be ok. Life is like this: once one lesson is learned, you will always apply that until it serves you. When it does not serve you anymore, it is time to transform it like an alchemist transform ordinary metals in precious metals. Do not be afraid of changing be afraid of remain unchangeable. The world is moving on and the changes are inevitable anyway, so why not to guide those changes to get where you want to be?

Enjoy!

Cheers

Agradecimentos

Aos meus pais, Allaymer e Márcia, por me incentivarem sempre a seguir meus sonhos, por serem modelos de ética, perseverança e dedicação extrema para atingir os objetivos, vocês são as pessoas mais importantes na minha vida, amo vocês.

A minha avó, Maria de Lourdes, e aos meus tios, Estela e Sérgio, pelo apoio, compreensão e companheirismo nesses últimos anos. Obrigada por terem me acolhido!

Aos meus irmãos, Lígia e Ronaldo, vocês são minha inspiração e admiro muito a força que cada um tem para atingir o que almejam.

To Joseph for the special presence in my life, thank you for all the support and love during this last year, you changed my life. Love you.

À minha orientadora, prof. Dra. Maria de Lourdes, por toda dedicação a esse trabalho e por ter sempre me apoiado a perseverar durante a pós-graduação.

Ao prof. Dr. Carlos Magno pelo imenso apoio e contribuição do começo ao fim do nosso projeto. Sua ajuda foi valiosa!

Aos colaboradores desse projeto: Ricardo, Moisés e Fernando pela dedicação e por muitas vezes colocar o projeto como prioridade. Realmente aprecio a imensa ajuda!

Ao meu amigo Carlos H. Camargo por sempre estar presente e contribuir na minha evolução sempre. Tenho você como mentor profissional.

Aos meus amigos e colegas do laboratório: Patrícia, Katheryne, Danilo, Thaís, Thaís França, Thaisa, Priscila, Valéria pelo companheirismo e amizade demonstrados todos esses anos.

À minha amiga Ligia pela amizade, apoio e pela presença em todos os momentos, você é muito especial.

À Eliane pelo companheirismo na jornada aos EUA e por ser um modelo de força, thank you!

À Vanessa Ito por ter trabalhado comigo na superação de muitos obstáculos para que eu pudesse concretizar meus sonhos, muito obrigada!

À Ana Claudia, secretária da microbiologia pela pronta disposição em sempre ajudar.

Às secretárias e funcionários da pós-graduação por todo auxilio prestado e pela pronta disposição.

À CAPES pelo financiamento do meu doutorado e pela concessão da bolsa de doutorado sanduiche em 2014.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1 Introdução..... 1

2 Objetivos..... 18

2.1 Objetivo Geral..... 18

2.1 Objetivos Específicos..... 18

3. Referências 20

Artigo 1: **Estudo do papel epidemiológico-molecular de *Staphylococcus aureus* no desenvolvimento de pneumonia associada à ventilação mecânica.....** 25

Resumo..... 25

1. Introdução..... 25

2. Metodologia..... 29

2.1 Local de estudo e casuística..... 30

2.2 Coleta de dados clínicos..... 30

2.3 Coleta, Isolamento e Identificação microbiana..... 30

2.4 Teste de sensibilidade antimicrobiana..... 31

2.5 Determinação da concentração inibitória mínima 31

2.6 Extração de ácido nucléico..... 32

2.7 Detecção do gene *mec*A..... 32

2.8 Classificação de SCC*mec* em *S. aureus*..... 32

2.9 Detecção dos genes de fatores de virulência 33

2.10 Visualização dos produtos amplificados..... 34

2.11 Caracterização e qualificação de modulinas fenol solúveis por HPLC..... 34

2.12 Quantificação da expressão de spa e hla por Western Blot..... 34

2.13 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)..... 35

2.14 Multilocus Sequence Typing (MLST)..... 35

2.15 Análise estatística dos fatores de risco..... 36

3. Resultados..... 37

3.1 Isolamento e identificação microbiana..... 37

3.2 Detecção do gene *mec*A, tipagem do cassete cromossômico e resistência antimicrobiana..... 37

3.3 Fatores de virulência em amostras de *S. aureus*..... 38

3.4 Caraterização clonal das amostras de *S. aureus*..... 39

3.5 Fatores de Risco..... 42

4. Discussão..... 47

5. Referências..... 52

Artigo 2**: Fatores de risco na etiologia de pneumonia associada a ventilação mecânica**..... 57

Resumo..... 57

1. Introdução..... 58

2. Metodologia..... 59

2.1 Local de estudo e casuística..... 59

2.2 Coleta de dados clínicos..... 61

2.3 Coleta, Isolamento e Identificação microbiana..... 61

2.4 Análise estatística dos fatores de risco..... 62

3. Resultados..... 63

3.1 Identificação microbiana, frequência dos patógenos e incidência de PAV..... 63

3.2 Fatores de risco para PAV..... 64

3.3 Fatores de risco para isolamento de micro-organismos de importância clínica 67

4. Discussão..... 70

5. Referências..... 75

Artigo 3: **Fatal pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* ST398 ……..** 78

Abstract..... 78

1. Introduction..... 79

2. Methods..... 81

2.1 Study design..... 81

2.2 Culture processing..... 81

2.3 Virulence and *mec*A gene detection; SCC*mec* typing..... 82

2.4 Antimicrobial susceptibility tests..... 82

2.5 ST398 PFGE……..…… 83

2.6 MLST..... 83

2.7 Spa typing..... 83

2.8 Production of isogenic gene deletion mutants..... 84

2.9 PSM analysis..... 84

2.10 Western blot..... 84

2.11 Neutrophil lysis and hemolysis assays..... 85

2.13 Mouse pneumonia model..... 85

2.14 Statistical analyses..... 85

3. Results..... 86

3.1 ST398 emerges as cause of severe and fatal pneumonia..... 86

3.2 The ST398 isolates show high expression of cytolytic toxins..... 88

3.3 The ST398 isolates show high cytolytic capacity and virulence in a murine pneumonia model…….. 93

4. Discussion..... 95

5. References..... 99

Suplemental tables..... 107

Conclusões..... 114

Anexos..... 116

Resumo

Pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) ocorre em pacientes em unidades de tratamento intensivo (UTI) com grande frequência sendo ocupando o primeiro lugar dentre infecções adquirida em sistemas de saúde. Os agentes mais frequentes isolados de PAV são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, os quais variam em frequência de acordo com o centro de estudo. A resistência a oxacilina (MRSA – Methicillin Resistant *S. aureus*) é amplamente disseminada em hospitais, além dessa espécie carrear diversos fatores de virulência. Dessa forma esse trabalho teve como principal objetivo verificar a influência dos fatores do hospedeiro bem como fatores microbiológicos no desfecho pneumonia com ênfase no estudo genético de *S. aureus*. Assim foi realizado uma coorte prospectiva de pacientes nas primeiras 48 horas da ventilação mecânica. Foram realizadas duas visitas semanais por até oito semanas para a coleta de aspirado traqueal e dados clínicos. Nos isolados de *S. aureus* foi traçado o perfil de resistência, clonal por PFGE, tipo sequencial por MLST, virulência, expressão de proteína A e alfa toxina por Western Blot, caracterização e quantificação de PMSs. *S. aureus* foi a espécie mais isolada na UTI onde 66% desses isolados participaram de eventos infecciosos do sistema respiratório, seguido por *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. MRSA foi isolado numa frequência de 43% classificados como SCC*mec* tipos I (4%), II (78%) e IV (17%), sendo que 45% desses foram isolados de pacientes com PAV. Os fatores de virulência mais frequentes foram *icaA*, *hla* e *hld*. A análise por PFGE das amostras de pacientes com PAV revelou a presença de grande diversidade clonal. Os tipos sequenciais mais frequentes foram ST105, ST5 e ST398. Fatores de risco independentes para o desfecho PAV por *S. aureus* foram a produção de PSMbeta 2, gene *sea* e presença de neoplasia sólida, enquanto os genes *hlb* e *sea* estavam associados ao óbito. Trauma foi o único fator de risco independente para o desenvolvimento de PAV. Em relação a estratificação de PAV segundo patógenos, trauma foi fator de risco para o desenvolvimento de PAV por *S. aureus e* por bacilos gram-negativo fermentadores, e esses tiveram outros fatores como sexo feminino e DSNC. Em relação aos fatores de risco para aquisição de *A. baumannii* foram a idade avançada e uso de esteróides, para o isolamento de *S. aureus* foi sexo masculino e para MRSA foi ter sido submetido a cirurgia. Não foram encontrados fatores de risco para os demais patógenos. Assim a presença de fatores microbianos, virulência e resistência, em conjunto com fatores do próprio paciente são cruciais no desenvolvimento da pneumonia e a utilização de glicopeptídeos foi associada negativamente ao desenvolvimento da PAV.

Abstract

Ventilator associated pneumonia (VAP) is the first cause of hospital acquired infections in patients in Intensive Care Units (ICU). The most frequent infectious agents isolated in VAP are *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, which vary according to the hospital. *S. aureus* methicillin resistant (MRSA) is frequently found in hospital environment, additionally this specie carry several virulence factors responsible to tissue invasion. Thereby, the aim of this work was verify the influence of host factors as well as the microbiologic factors in pneumonia outcome with emphasis in *S. aureus* genetic study. The study design was a cohort study including patients in the first 48 hours of mechanical ventilation and followed up twice a week for up to 8 weeks. More profound analysis was conducted for *S. aureus* isolates accessing the resistance profile, clonal characteristics by PFGE, sequence type by MLST, virulence by PCR, protein A and alpha toxin expressions by Western Blot, HPLC for PSM expressions. *S. aureus* was the most isolated specie in ICU and 66% of the isolates were causing respiratory infections. The frequency of MRSA in our ICU was 43% and the SCC*mec* types were I (4%), II (78%) e IV (17%). The most frequent virulence factors were *icaA*, *hla* e *hld*. The clonal profile of strains isolated from VAP showed a variety of strains not clustered. The most frequent sequence types in this study were ST105, ST5 and ST398. Independent risk factors for *S. aureus* VAP were PSMbeta 2 production, the presence of *sea* gene and solid cancer, while the presence of *hlb* and *sea* genes were associated to death. Trauma was the only predictor factor associated to VAP. Regarded to the stratification according to pathogen type, we found that trauma was a risk factor to *S. aureus* VAP and also for *Enterobacteriacea*, which also included belonging to female gender and presenting central nervous system disease. Age and steroids usage were associated to the isolation of *A. baumannii*, male gender was associated to isolation of *S. aureus* and surgery was a risk factor for MRSA isolation. No risk factors were associated to the isolation of other pathogens. Therefore, the presence of microbiological factors, virulence and resistance together with patient characteristics were crucial for VAP development and the usage of glicopeptides was negatively associated to VAP development.

1. Introdução

1.1 Classificação da pneumonia

Frequentemente as vias respiratórias são desafiadas por diversos micro-organismos, onde a instalação de patógenos no pulmão e o desenvolvimento de uma infecção é determinada pela capacidade de "clearence" do sistema imune e da patogenicidade do micro-organismo. Adicionalmente, a determinação dos fatores de risco para os diferentes tipos de pneumonia constitui-se de um dado importante na identificação de grupos que necessitam de maior atenção para predizer o prognóstico, uma vez que a etiologia varia conforme a origem da infecção (1).

As pneumonias são classificadas de acordo com o tempo em que se desenvolvem e do contato do paciente com o sistema de saúde. Pneumonia adquirida na comunidade (PAC) ocorre em indivíduos residentes na comunidade sem contato prévio com instituições de cuidado à saúde ou o seu desenvolvimento ocorre dentro de 48 horas da internação (2). Pneumonias nosocomiais são classificadas de acordo com a utilização de ventilação mecânica. A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) se desenvolve acima de 48 horas do início da ventilação. Por outro lado, se o desenvolvimento ocorre dentro de 48 a 72 horas da admissão hospitalar sem o uso de ventilador, é classificada como Pneumonia adquirida em hospital (PAH), tendo como agentes etiológicos caracteristicamente hospitalares (2, 3). E outro grupo de pneumonias aquelas associadas a instituições de cuidado à saúde (HCAP) acometem pacientes não hospitalizados, mas que mantém contato com ambulatórios ou instituições de longa permanência e que foram

submetidos a um ou mais dos seguintes procedimentos: terapia intravenosa, tratamento de feridas, quimioterapia durante os primeiros 30 dias, hemodiálise, hospitalização para cuidados agudos por dois ou mais dias, permanência em enfermaria ou outro setor de cuidados a longo prazo (3).

Recentemente a definição de PAV sofreu uma atualização entrando na definição de eventos associados a ventilação mecânica (EAV) como traqueobronquite, traqueíte e pneumonia. A definição de EAVs inclui condições normalmente infecciosas que resultam em baixa oxigenação, determinada pela necessidade de maior quantidade de oxigênio inspirado por dia. Essa nova definição promete contribuir para a realização de uma vigilância das infecções hospitalares de forma mais uniforme e consistente (4).

A ventilação mecânica (VM) consiste em um suporte respiratório artificial com principal objetivo de manter as trocas gasosas de uma forma mais eficiente para o paciente. Os critérios para a indicação da utilização da VM em pacientes são definidos de acordo com a instabilidade respiratória onde não existe troca adequada de O_2 e CO_2 colocando em risco a vida do paciente em questão (5).

Quando o sistema de ventilação mecânica é instalado o dispositivo chamado cuff é responsável por selar o contato entre a traquéia e o tubo endotraqueal promovendo uma pressão positiva de ventilação prevenindo o desenvolvimento de pneumonia por aspiração de secreções das vias superiores. A pressão do cuff exige manutenção uma vez que, se não estiver instalada corretamente facilita a aspiração de secreções orofaríngeas associada a maior ocorrência de pneumonia. As principais

vias infecciosas para o pulmão são bactérias que colonizam a nasofaringe, sinos nasais e o estômago (6). A formação de biofilme no tubo endotraqueal, microaspiração de secreção, acúmulo de secreção ao redor do cuff e diminuição dos reflexos de tosse são fatores que facilitam o transporte e a instalação de patógenos nos pulmões (7).

Algumas condições do paciente facilitam a aspiração como o período pós-operatório, o uso de medicamentos sedativos do sistema neuromuscular, uso de sondas, a presença de sonda de alimentação enteral e a posição de decúbito supinal. A aspiração ocorre em 45% dos indivíduos hígidos e com muita frequência associada a distensão abdominal, a presença de sondas nasogástricas e cânulas traqueais. O período pós-operatório (POT) aumenta o risco de aquisição de pneumonias, principalmente em pacientes com fatores de riscos adicionais, como obesos, idosos, desnutridos, tabagistas, pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou traqueostomizados, e outros fatores adicionais. Medicamentos sedativos modificam a motilidade dos cílios do trato respiratório ocasionando um acúmulo de secreções que normalmente eliminariam o patógeno (2).

Fatores de risco para o desenvolvimento de PAV em UTIs podem ser classificados em modificáveis e não modificáveis. Fatores modificáveis constituem do uso de antibióticos, uso de antiácidos, traqueostomia, posição de supino, nutrição parenteral e outros. Os fatores não modificáveis estão relacionados a condições de base do paciente como AIDS, ser do sexo masculino, coma, doença pulmonar preexistente, trauma craniano e falha de órgãos. Alguns fatores não modificáveis

estão relacionados a procedimentos necessários como neurocirurgia, monitoramento da pressão intracraniana, re-intubação e transporte externo à UTI (8). Assim fatores de base do paciente, relacionados a controle de infecção hospitalar ou relacionado a intervenções interferem no desenvolvimento da pneumonia. A idade avançada é um fator de risco para aquisição de todos os tipos de pneumonia (3, 9, 10).

1.2 Patogênese e etiologia da PAV

A pneumonia é considerada a primeira causa de infecção relacionada à saúde nos Estados Unidos (11) e ocupa o primeiro lugar em serviços de tratamento intensivo, e, na presença de respiradores artificiais, o risco de aquisição pode aumentar em 20 vezes (12, 13). *Staphylococcus aureus* é o principal agente de pneumonia hospitalar, ocupando o segundo lugar na etiologia dentre todas as infecções hospitalares (11). A pneumonia nosocomial é responsável por 15% das infecções hospitalares e afeta de 0,5 a 2% dos pacientes hospitalizados apresentando letalidade acima de 30%, sendo que os maiores índices encontram-se entre os pacientes submetidos à ventilação mecânica (14). Cerca de 80% dos episódios de pneumonia nosocomial estão associadas a ventilação, com densidade de incidência variando de 10 a 20 episódios para cada 1000 dias de ventilação mecânica em risco diário aumentado de 1 a 3% (13). A VAP apresenta taxa de mortalidade entre 24 a 44% (15, 16) valores superiores a taxa de mortalidade de outros tipos de infecções nosocomiais (2, 15).

A patogênese da PAV reside na colonização do trato respiratório superior (orofaringe e traquéia) por micro-organismos potencialmente patogênicos da família

Enterobacteriaceae, e espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa,* enquanto que a colonização do trato gastrintestinal possui um papel minoritário (14, 17). Dentre os agentes mais comuns de pneumonias nosocomiais estão as espécies de bacilos gram negativos entéricos (BGNE), cocos gram positivos e considerável porcentagem das pneumonias são de origem polimicrobiana (14). Segundo Shorr et al. (18) 61% dos pacientes com pneumonia adquirida em hospitais foram acometidos por MRSA. Pobo et al (19) em estudo prospectivo de VAP verificaram que em 63,6% dos episódios de PAV cuja etiologia foi determinada, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* foram os micro-organismos mais frequentemente isolados.

Micro-organismos multirresistentes são isolados de infecções no ambiente hospitalar. Em UTI os principais agentes causadores de infecções são *P. aeruginosa* e o *Acinetobacter baumannii* e pacientes internados nessas unidades apresentam risco de 10 a 20 vezes maior de adquirir pneumonia, sendo que 7 a 40% desses pacientes estão submetidos a ventilação mecânica ou umidificador, com esses números variando conforme o hospital (12).

O *bundle* ou pacote de medidas de prevenção de PAV proposto pelo *Institute for Health Improvement* é considerado altamente aplicável em ambientes hospitalares (17). O *bundle* é composto de práticas baseadas em evidência, sendo um instrumento com parâmetros claros que quando implantado de forma sistemática e uniforme apresenta benefício ao paciente. Para evitar a pneumonia por aspiração aconselha-se evitar a posição de supino total, com elevação da cabeça no leito (ângulos 30º a 45º), prevenir a colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos com

higiene oral com clorexidina, cuidados com o circuito do respirador, interrupção diária da sedação por uma hora, profilaxia do desenvolvimento de úlcera péptica e profilaxia do desenvolvimento de trombose venosa profunda (17, 20). Dados da Comissão de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (CCIRAS) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) revelaram uma redução de PAV nas UTIs do Hospital após a adesão ao *bundle* (cabeceira elevada 30-45°, higiene oral com clorexidina, posicionamento adequado do circuito, pressão do cuff aferida duas vezes ao dia e interrupção diária da sedação por uma hora), com queda na média mensal de 9 para 4 PAV na UTI central e de 5 para 3 na UTI do Pronto Socorro, com redução significativa nas taxas de incidência mesmo sem a adesão ter sido boa para todos os componentes do *bundle*.

1.3 Papel de *Staphylococcus aureus* na etiopatologia da PAV

Pneumonias causadas por *S. aureus* estão associadas a altos índices de falha de tratamento (21). Estudos revelam a importância da participação de *S. aureus* no desfecho das PAV, onde fatores adicionais à resistência antimicrobiana associam a recorrência da infecção, superinfecção, sepse severa ou mortalidade nesses pacientes (22).

As infecções causadas por espécies de *Staphylococcus* spp. eram inicialmente tratadas com penicilina introduzida em 1940 até o surgimento de cepas resistentes produtoras de penicilinase no ambiente hospitalar (23). Pouco tempo depois, resistência a penicilina se expandiu entre cepas de origem comunitária tornando

necessário buscar antimicrobianos alternativos para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* (24).

Duas décadas depois a frequência da resistência ultrapassava os 70% entre cepas de *S. aureus* de origem hospitalar e comunitárias (23). Assim houve a necessidade de buscar alternativas de tratamento onde a adição do ácido 6-aminopenicilânico na molécula da penicilina proporcionou proteção do anel beta lactâmico contra a ação da beta-lactamase ou penicilinase, criando a meticilina e a oxacilina, penicilinas semi-sintéticas. Entretanto, em pouco tempo surgiram as primeiras cepas resistentes a esses antibióticos. Essas novas cepas emergentes foram denominadas de MRSA (Methicilin Resistant *S. aureus*) (23, 25).

Pneumonias (PNs) causadas por MRSA são geralmente difíceis de tratar e estão associadas a altas taxas de falha no tratamento. Cepas MRSA carreiam o gene *mec*A que confere resistência a antibióticos beta-lactâmicos em um elemento genético móvel de tamanho e composições genéticas variáveis. A tipagem do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) é de importância epidemiológica e pode ser útil para fins de tratamento clínico. Atualmente existem 11 tipos (I ao XI) (26) com a distribuição epidemiológica I ao III em hospitais e os outros tipos associados à comunidade. Estudo de Haque et al. (27) sugere que associação entre o SCC*mec* tipo II e fatores de base do hospedeiro aumentem o risco de mortalidade, ao alto MIC para vancomicina e a falha terapêutica clínica em pacientes com pneumonia hospitalar causada por MRSA.

A resistência a antimicrobianos é um fator importante entre pacientes acima de 60 anos afetados por PNs causadas por micro-organismos multirresistentes (resistência a duas ou mais diferentes classes de antimicrobianos). Ainda, pacientes com pneumonia são frequentemente admitidos em UTIs e apresentam altas taxas de falha do tratamento inicial associados a piores prognósticos (28).

O tempo de permanência hospitalar aumenta em quase 3 milhões de dias a cada 1% de infecção hospitalar causada por *S. aureus* nos Estados Unidos, gerando, assim, uma despesa em torno de 10 bilhões de dólares por ano. Adicionalmente, pacientes com infecções por MRSA estão relacionadas a maior morbimortalidade em comparação àqueles com infecção por outros patógenos resistentes (29).

As PNs causadas por MRSA são mais frequentes do que as causadas por MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina). Assim, ambos os grupos estão associados à significativa mortalidade, morbidade e altos custos de cuidado à saúde, mesmo com o início do tratamento antimicrobiano apropriado (18).

A colonização por MRSA do trato respiratório superior pode ser a principal causa do desenvolvimento de infecções nas vias respiratórias inferiores. A análise de 72 amostras isoladas de escarro, da cavidade nasal e da faringe de 24 pacientes hospitalizados colonizados por MRSA, demonstrou que 68 cepas isoladas foram positivas para o gene da TSST-1 e enterotoxina C e, uma amostra positiva somente para enterotoxina A (*sea*). A análise por PFGE demonstrou que as amostras de MRSA isoladas do escarro e da cavidade nasal eram praticamente idênticas em 88% dos pacientes. Os 12% restantes mostraram-se diferentes nessas amostras, mas possuíam

MRSA com características muito similares na faringe e no escarro. Dessa forma, a colonização do trato respiratório superior por MRSA é o primeiro processo patológico que leva ao desenvolvimento de infecção broncopulmonar por MRSA (30).

Enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), possuem um papel importante nas infecções humanas. São altamente resistentes a diversos fenômenos químicos e físicos (dessecação, aquecimento, ao tratamento com enzimas e ácidos) o que garante maior tempo de ação no organismo (31). Estudos experimentais realizados em coelhos revelam que a instilação intrapulmonar de SEB e SEC induzem hemorragia no tecido pulmonar, angústia respiratória e síndrome do choque tóxico letal. Quando administradas cepas carreadoras dos genes para as mesmas enterotoxinas, observou-se patologia pulmonar e letalidade similar ao grupo no qual administraram-se as toxinas purificadas (32).

Aproximadamente 15% das amostras isoladas em instituições de saúde apresentam o gene da PVL (Leucocidina Panton-Valentine) (18). A PVL causa pneumonia necrotizante e está frequentemente associada às amostras de CA-MRSA (community acquired methicillin-resistant S*taphylococcus aureus*). A presença de PVL nos pulmões causa hemorragia, extensiva necrose dos septos alveolares, destruição do epitélio que recobre os brônquios e os bronquíolos (33) e cortes histopatológicos mostram lesões necróticas na mucosa da traquéia (34).

Cepas de *S. aureus* carreiam diversos tipos de fatores de virulência simultaneamente. Estudos realizados nos Estados Unidos relatam que a cepa de *S.*

aureus USA400 responsável pela pneumonia letal em três crianças, apresentava como fatores de virulência citotoxinas alfa e gama, PVL, modulinas fenol-solúveis (PSMs), enterotoxina estafilocócica (SE) B ou C. O perfil toxigênico de cepas de USA300 é semelhante, com exceção da enterotoxina estafilocócica-like (SE-l) Q presente nessas cepas. CA-MRSA USA 100 e 200 têm emergido com perfis alfa$^{+/-}$ e gama-toxina$^{+/-}$, PVL$^{+/-}$, PSMs^{+} e TSST-1^{+}. A produção de várias citotoxinas combinadas com ação de superantígenos culmina numa doença devastante (35).

Pneumonias causadas por CA-MRSA estão frequentemente associadas a co-infecção pulmonar viral. Estudos revelam que CA-MRSA são agentes comumente encontrados em pneumonias durante a temporada da influenza, e por volta de 85% dessas cepas de *S. aureus* isoladas possuíram o gene da PVL. Em três casos graves de pneumonia necrotizante, foram utilizadas estratégias bem sucedidas para interferir na síntese da leucocidina, administrando antimicrobianos como rifampicina, linezolida e clindamicina, e/ou aplicando imunoglobulina intravenosa para bloquear o efeito lítico da PVL sobre as células polimorfonucleares (36). Durante a temporada de influenza em 2006 e 2007, foram relatados 51 casos de pneumonia em centros de saúde por *S. aureus*, e 79% foram causados por MRSA. A maioria dos casos de pneumonia por MRSA ocorreram durante ou após a infecção viral (37).

Além da associação da PVL nos casos descritos acima, a alfa-toxina e a proteína A, são fatores de virulência necessários ao desenvolvimento de pneumonia por *S. aureus* (38). A ação da alfa-toxina e da PVL consistem em formar poros nas células dos polimorfonucleares e com isso provocam uma resposta exagerada pela

liberação de citocinas e espécimes de oxigênio reativo quando presentes simultaneamente, contribuindo assim com o dano no tecido pulmonar (39).

A alfa hemolisina ou citotoxina (codificada pelo gene *hla*) é uma das mais proeminentes citotoxinas que tem como alvo eritrócitos, células epiteliais, endoteliais, células T, neutrófilos, monócitos e macrófagos. A alfa-toxina consiste de uma molécula anfipática, hidrossolúvel e formadora de poros que se liga principalmente a lipídeos presentes na membrana da célula do hospedeiro (40). A ação combinada de Hla e PSM, exerce um papel essencial para o estabelecimento de infecções. A deleção do locus que codifica as PSMs interfere na produção de hla que enfraquece a capacidade de dano tecidual induzido pelo patógeno (41). A presença de alfa-toxina provoca uma congestão pulmonar por ser altamente inflamatória (31).

As PSMs são classificadas de acordo com o tamanho: o tipo alfa é composto de 20-25 aminoácidos e o tipo beta, com o dobro do tamanho, de 43-45 aminoácidos, e todas formam uma α-hélice com característica anfipática. A PSM α é carregada positivamente enquanto que a PSMβ possui carga negativa. Os genes das PSMs estão presentes no genoma de virtualmente todas as cepas de *S. aureus*. As PSMs são codificadas por 4 genes no locus alfa (1 a 4), 2 genes no locus beta (1 e 2), a delta toxina- uma modulina presente no locus do RNAIII - e PSM*mec* presente no SCC*mec* tipo II, III e VIII. A regulação da síntese das modulinas é realizada pelo sistema de regulação global, o sistema Agr, e seu transporte para o meio extracelular realizado pelo seu transportador pmt. O transportador das modulinas é essencial para a célula pois, na sua ausência, as modulinas se acumulam no citoplasma levando a um

crescimento celular defeituoso. A estrutura das modulinas é composta por uma porção N-terminal-N-formil e, em certos eventos celulares, a porção N-formil é removida pela enzima N-deformilase gerando uma forma deformilada (PSM-DF). Especula-se que a função principal dessas PSM-DF sejam estabilização do biofilme, de acordo com testes *in vitro*, pois são capazes de se polimerizar e formar estruturas amilóides e fibrilares. As PSM-DF possuem um baixo poder pró-inflamatório e a ocorrência dessa forma é mais frequente em *S. aureus* que em *S. epidermidis (*42*)*.

A PSM*mec* possui atividade similar ao tipo alfa e sua deleção pode aumentar a expressão das modulinas basais devido ao impacto negativo que o locus em questão exerce sobre o sistema Agr. O papel das modulinas pode variar com a forma em que a bactéria se encontra, como em forma de biofilme, intracelular ou extracelular. As modulinas atuam principalmente como citolisinas para osteoblastos, células epiteliais, monócitos, eritrócitos e polimorfonucleares onde as PSM alfa são mais potentes. Sua atuação é livre de qualquer receptor nas células do hospedeiro o que facilita sua participação em diversos eventos infecciosos (42).

Outro fator de virulência importante na patogenia da pneumonia por *S. aureus* é a formação de biofilme codificada pelos genes presentes no operon *ica* (*icaA, icaB, icaC* e *icaD*). Essas estruturas, compostas de exopolissacarídeos, proporcionam maior proximidade entre as bactérias facilitando o "quórum sensing". Nesse caso, as bactérias recebem sinais químicos para liberação do biofilme ou para sintetizar outros fatores de virulência. Em caso de formação de biofilme o tratamento é mais difícil, uma vez que sua estrutura não permite a penetração do antimicrobiano sendo

necessária uma concentração do fármaco de 10 a 1000 vezes maior do que necessitaria para bactérias livres (43).

Além desses fatores de virulência na patogênese da pneumonia, a beta hemolisina (hlb) também foi relacionada à lesão pulmonar como demonstrado por Hayashida et al. (39). A hlb possui a capacidade de aumentar o influxo de neutrófilos no pulmão e nos espaços alveolares, provocar o extravasamento de proteínas do soro para dentro do parênquima pulmonar e exsudação de fluido rico em proteína dentro da via aérea. A migração de neutrófilos é indiretamente modulada pela beta-hemolisina através da estimulação de outros fatores do hospedeiro. Com isso, a virulência da hemolisina consiste em aumentar a regulação de várias citocinas pró-inflamatórias e gerar uma resposta exagerada no hospedeiro (39).

1.4 Diagnóstico clínico, laboratorial na escolha do tratamento da pneumonia

O diagnóstico microbiológico de pneumonias é de difícil realização devido à alta probabilidade de contaminação da amostra, no momento da coleta, com micro-organismos potencialmente patogênicos colonizadores do trato respiratório superior. Esses, quando presentes, podem interferir no crescimento do agente patogênico da pneumonia gerando um resultado não confiável (44).

Achados clínicos e radiológicos são ferramentas utilizadas pela equipe médica para diagnosticar pneumonias, uma vez que outras patologias podem apresentar sintomas clínicos semelhantes (3). A cultura microbiana não é mandatória, mas auxilia a conduta terapêutica e, após a correta identificação e adequação terapêutica,

observou-se melhora em aproximadamente 63% dos pacientes acometidos por VAP (3, 45).

Existem várias vias que podem ser utilizadas para coleta de material destinado ao diagnóstico microbiológico de pneumonias, como o escarro, escarro induzido, aspirado traqueal, lavado brônquico, lavado broncoalveolar, escovado brônquico protegido e biópsia transbrônquica (44) variando a especificidade e sensibilidade do diagnóstico. A cultura quantitativa do aspirado endotraqueal é um método amplamente utilizado devido ao fácil acesso, baixo custo e boa sensibilidade. Mesmo apresentando uma especificidade menor em comparação ao lavado broncoaoveolar, o método proporciona uma avaliação bacterioscópica local orientando a terapêutica inicial. Em contraste, o escovado brônquico protegido, a coleta do material é realizada por meio de um cateter de duplo-lúmen com escova no interior, ocluída com polietilenoglicol; é um dos métodos de fácil execução e de alta especificidade, mas de baixa sensibilidade. O lavado broncoalveolar simples é muito utilizado, proporciona análise de micro-organismos fagocitados e tem sensibilidade e especificidade variáveis, mas apresenta-se muito útil no diagnóstico das PAV. Em relação ao método de avaliação pelo lavado broncoalveolar protegido, há vantagem de apresentar alta sensibilidade e especificidade, porém ambos métodos são considerados invasivos (2).

Um estudo comparou as técnicas de aspirado endotraqueal quantitativo (AEQ), lavado broncoalveolar e escovado protegido para o diagnóstico de PAV em pacientes com falha terapêutica mostrando que o AEQ é um método confiável para o

diagnóstico da PAV. Os resultados obtidos mostraram que o aspirado endotraqueal quantitativo, utilizando o ponto de corte 10^5 UFC/ml, apresentou sensibilidade de 92,8%, especificidade de 80% e valor preditivo negativo de 88,9%. Esses dados mostram que a cultura de aspirado endotraqueal quantitativo é um método prático e barato para diagnóstico de PAV e pode ser realizado diversas vezes por ser um método não invasivo e de baixo risco para o paciente (46).

Segundo Michel et al. (47), pacientes com suspeitas de VAP foram submetidos a duas coletas semanais de aspirado endotraqueal (AE) para identificação do patógeno, comparando o diagnóstico com lavado broncoalveolar (LBA). Em 41 de 75 pacientes foram identificados os agentes etiológicos através do LBA. Dessas 41 amostras isoladas, as culturas quantitativas de AE isolaram os mesmos micro-organismos com mesmo perfil de susceptibilidade em 84% das amostras. A utilização dos dados microbiológicos obtidos por AE permitiram que 95% dos pacientes fossem tratados corretamente. Dessa forma constatou-se que o AE constitui uma ferramenta diagnóstica útil para o início do correto tratamento (47).

Apesar dessas considerações, ainda não há consenso sobre os métodos microbiológicos para diagnóstico das pneumonias. Um método ideal deve apresentar altas sensibilidade e especificidade, e ser seguro para o paciente.

A escolha do antimicrobiano e quando introduzi-lo é de fundamental importância para o prognóstico do paciente. A demora no tratamento expõe o paciente a maior risco de morte (48, 49). Aproximadamente 40% dos pacientes vem a

óbito devido à demora no tratamento inicial (49) ou devido à antibioticoterapia inadequada (48).

Inicialmente a escolha do tratamento empírico é feita considerando o risco de infecção por um patógeno resistente, além de considerar os padrões microbiológicos e de resistência locais (2, 3). Quando há risco de patógeno multirresistente estar envolvido na infecção, a maioria dos guidelines preconiza o uso da combinação de antimicrobianos, no entanto utiliza a monoterapia se o paciente não está em risco (3). A duração do tratamento é de 7-8 dias na maioria dos casos, e de aproximadamente 14 dias quando se trata de bacilo gram-negativo não fermentador (3).

A diretriz brasileira orienta o tratamento das PNs de acordo com a gravidade do quadro, caso o agente presumido seja *S. aureus*, e haja alto risco de resistência à oxacilina, a classe dos glicopeptídeos deve ser a escolhida, porém se o agente for oxacilino-sensível, a oxacilina deve ser o antimicrobiano de escolha. Em caso de BGN existe uma ampla gama de escolhas dependendo da gravidade do quadro e do patógeno presumido, sendo possível a antibioticoterapia combinada de classes de antimicrobianos (2).

A vancomicina, até a presente data, é a droga de escolha para o tratamento de MRSA, pois muitos isolados apresentam resistências adicionais a outras classes de antimicrobianos. Antes da introdução de novos fármacos para o tratamento de infecções causadas por MRSA, a vancomicina era amplamente utilizada em diversos quadros infecciosos, porém para o tratamento de pneumonia por MRSA a vancomicina não é aconselhada, uma vez que sua concentração no pulmão não é

maior que 20% da concentração no soro, além de possuir baixa penetrabilidade em diferentes partes do tecido pulmonar. Além disso, há necessidade de dosagem frequente da concentração desse fármaco no sangue (vancocinemia) para evitar a nefrotoxicidade (50).

Em casos de pneumonias causadas por MRSA, a linezolida pode ser uma boa opção por apresentar alto volume de distribuição e boa penetração pulmonar (51). O mecanismo de ação da linezolida consiste na ligação na subunidade ribossomal 50S afetando a tradução das proteínas interferindo assim, na síntese de toxinas, o que pode auxiliar no sucesso do tratamento de pacientes acometidos por cepas toxigênicas (51). Em relação a taxa de resolução da infecção em resposta ao tratamento com quinupristina/dalfopristina, é similar à da vancomicina (52).

Apesar da grande importância do estudo epidemiológico, pouco se sabe sobre o comportamento de virulência, clonalidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* implicados na PAV. A busca dos fatores de virulência envolvidos no desenvolvimento da PAV pode trazer a luz marcadores moleculares, além de auxiliar na descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento mais eficaz da pneumonia (53).

A partir das considerações acima, a hipótese desse estudo é que os fatores microbianos exercem influência no desenvolvimento da PAV por *S. aureus* em conjunto com os fatores de risco do hospedeiro.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Isolar os agentes bacterianos e verificar sua associação com o desfecho PAV, avaliar a influência de fatores de base do hospedeiro como preditores de aquisição de patógenos, avaliar a epidemiologia e os fatores de virulência em *S. aureus* e estabelecer associações com os desfechos pneumonia e óbito.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar os agentes causadores de pneumonia e calcular a incidência de PAV.
- Analisar os fatores do hospedeiro e os diferentes patógenos como preditores de PAV.
- Analisar os fatores do hospedeiro como preditores de aquisição de patógenos.
- Nas espécies de *S. aureus;*
    - Avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* e detectar pela técnica molecular o gene de resistência a oxacilina, *mec*A e caracterizar o cassete cromossômico (SCC*mec*).
    - Detectar genotipicamente os fatores de virulência e patogenicidade: hemolisinas, enterotoxinas, biofilme e leucocidina.
    - Detectar e quantificar a produção de modulinas fenol solúveis (PSM's).
    - Quantificar a expressão de proteina A (spa) e hemolisinaα□(hla) por Western Blot.

- Analisar pelo método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e por Multilocus Sequence Typing (MLST) o perfil clonal dos isolados.
- Estabelecer associações entre os dados microbiológicos/moleculares com o desfecho do quadro.

3. Referências[1]

1. Esperatti M, Marti AT. Pneumonia. Elsevier. 2008; 133-44.

2. SBPT – Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia 2001. Parte II – Pneumonia nosocomial. Consenso Brasileiro de Pneumonias em Indivíduos Adultos Imunocompetentes. J Pneumol 27(Supl 1) – abril de 2001. Disponível em: http://www.jornaldepneumologia.com.br/portugues/suplementos_caps.asp?id =53 Acessado em: 28 abr 2011.

3. File TM Jr. Recommendations for treatment of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: review of recent international guidelines. Clin Infect Dis. 2010;51 Suppl 1:S42-7. doi: 10.1086/653048.

4. Raoof S, Baumann MH. An official multi-society statement: ventilator-associated events: the new definition. Chest. 2014;145(1):10-2. doi: 10.1378/chest.13-2731.

5. Carvalho CRR, Toufen Jr C, Franca SA. Ventilação mecânica: princípios, análise gráfica e modalidades ventilatórias. J Bras Pneumol. 2007;33:54-70. ISSN 1806-3713.

6. Zolfaghari PS., Wyncoll DLA. The tracheal tube: gateway to ventilator-associatedpneumonia. Critical Care. 2011;15:310.

7. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. Critical Care. 2014;18:208.

8. Bonten MJM, Kollef MH, Hall JB. Risk Factors for Ventilator-Associated Pneumonia: From Epidemiology to Patient Management. Clinical Infectious Diseases. 2004;38:1141–9.

9. Fortaleza CMCB, Abati PAM, Batista MR, Dias A. Risk Factors for Hospital-Acquired Pneumonia in Nonvantilated Adults. Braz J Infect Dis. 2009;13(4):284-88.

10. Jeon JE, Cho SG, Shin JW, Kim JY, Prk IW, Choi BW, Choi JC. The Difference in Clinical Presentations between Healthcare-Associated and Cummunity-Acquired Pneumonia in University-Affiliated Hospital in Korea. Yonsei Med J. 2011;52(2):282-87.

11. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK. Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med. 2014;370(13):1198-208.

[1] Referências formatadas de acordo com o estilo Vancouver conforme orientações da biblioteca.

12. Oliveira LCBS, Carneiro PPM, Fischer RG, Tinoco EMB. Presence of Respiratory Pathogens in the Oral Biofilm of Patients with Nosocomial Pneumonia. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 2007;19(4).

13. Diaz E, Lorente L, Valles J, Rello J. Mechanical ventilation associated pneumonia. Med Intensiva. 2010;34(5):318-24. doi: 10.1016/j.medin.2010.03.004.

14. Lynch III, JP. Hospital-Acquired Pneumonia: Risk Factors, Microbiology, and Treatment. Chest. 2001; 119; 373S-384S.

15. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:867–903.

16. Inchai J, Pothirat C, Liwsrisakun C, Deesomchok A, Kositsakulchai W, Chalermpanchai N.Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and prognostic indicators of 30-day mortality. Jpn J Infect Dis. 2015;68(3):181-6. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.282. Epub 2014 Dec 24.

17. Bonten MJM.Ventilator-Associated Pneumonia: Preventing the Inevitable. Clin Infect Dis. 2011;52(1):115–121.

18. Shorr AF, Haque N, Taneja C, Zervos M, Lamerato L, Kothari S, Zilber S, Donabedian S, Perri MB, Spalding J, Oster G. Clinical and economic outcomes for patients with health care-associated Staphylococcus aureus pneumonia. J Clin Microbiol. 2010;48(9):3258-62. doi: 10.1128/JCM.02529-09.

19. Pobo A, Lisboa T, Rodriguez A, Sole R, Magret M, Trefler S, Gómez F, Rello J. A Randomized Trial of Dental Brushing for Preventing Ventilator-Associated Pneumonia. Chest. 2009;136 (2): 433-439.

20. Munro N, Ruggiero M.Ventilator-associated pneumonia bundle: reconstruction for best care.AACN Adv Crit Care. 2014;25(2):163-75; 176-8. doi: 10.1097/NCI.0000000000000019.

21. Malangoni MA, Crafton R, Mocek FC. Pneumonia in the Surgical Intensive Care Unit: Factors Determining Successful Outcome. Am J Surg. 1994; 167:250-55.

22. Zahar JR, Clec'h C, Tafflet M, Garrouste-Orgeas M, Jamali S, Mourvillier B, Lassence A, Descorps-Declere A, Adrie C, Beauregard MAC, Azoulay E, Schwebel C, Timsit JFO. Is Methicillin Resistance Associated with a Worse Prognosis in Staphylococcus aureus Ventilator-Associated Pneumonia? Clin Infect Dis. 2005; 41:1224–31.

23. Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43: 399-406.

24. Saïd-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W, et al. Differential Distribution and Expression of Panton-Valentine Leucocidin among

Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains. J Clin Micr. 2005;43:3373–3379.

25. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. Rev Panam Infectol. 2005; 7: 34-36.

26. SCCmec.org. website on the internet: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html accessed 01/jun/2015.

27. Haque NZ, Arshad S, Peyrani P, Ford KD, Perri MB, Jacobsen G, Reyes K, Scerpella EG, Ramirez JA, Zervos MJ. Analysis of pathogen and host factors related to clinical outcomes in patients with hospital-acquired pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2012;50(5):1640-4. doi: 10.1128/JCM.06701-11.

28. Jeon JE, Cho SG, Shin JW, Kim JY, Prk IW, Choi BW, Choi JC. The Difference in Clinical Presentations between Healthcare-Associated and Cummunity-Acquired Pneumonia in University-Affiliated Hospital in Korea. Yonsei Med J. 2011;52(2):282-87.

29. Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ, et al. The burden of Staphylococcus aureus infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. Arch Intern Med. 2005;165:1756–1761.

30. Watanabe H, Masaki H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Kobayashi S, Sato A, Nagatake T. Molecular Analysis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus as a Causative Agent of Bronchopulmonary Infection: Relation to Colonization in the Upper Respiratory Tract. J Clin Micr. 2000;38(10):3867–3869.

31. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3):422-47. doi: 10.1128/CMR.00104-12.

32. Strandberg KL, Rotschafer JH, Vetter SM, Buonpane RA, Kranz DM, Schlievert PM. Staphylococcal superantigens cause lethal pulmonary disease in rabbits. J Infect Dis. 2010;202:1690–1697.

33. Zhang K, Mcclure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Micr. 2005;43:5026–5033.

34. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clinical Infectious Diseases. 1999;29: 1128–32.

35. Schlievert PM. Cytolysins, Superantigens, and Peneumonia due to Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2009;200(5): 676–678.

36. Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou JY, Pasquier P, Stamm D, Brinquin L, Pelletier C, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Gillet Y. Prompt and Successful Toxin-Targeting Treatment of Three Patients with Necrotizing Pneumonia Due to *Staphylococcus aureus* Strains Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes. J Clin Microb. 2010;48(5):1952–1955.

37. Kallen AJ, Brunkard J, Moore Z, Budge P, Arnold KE, Fosheim G, Finelli L, Beekmann SE, Polgreen PM, Gorwitz R, Hageman J. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. Ann Emerg Med. 2008;53(3):358-65. doi: 10.1016/j.annemergmed.2008.04.027.

38. Wardenburg JB, Patel RJ, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. Infect Immun. 2007;75:1040-4.

39. Hayashida A, Bartlett AH, Foster TJ, Park PW. *Staphylococcus aureus* Beta-Toxin Induces Lung Injury through Syndecan-1. Am J Pathol. 2009;174(2):509-18. doi: 10.2353/ajpath.2009.080394.

40. Berube BJ, BubeckWardenburg J. *Staphylococcus aureus* α-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins (Basel). 2013;5:1140-66.

41. Berube BJ, Sampedro GR, Otto M, BubeckWardenburg J. The psmα locus regulates production of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin during infection. Infect Immun. 2014;82:3350-8.

42. Cheung GY, Joo HS, Chatterjee SS, Otto M. Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. FEMS Microbiol Rev. 2014;38:698-719. doi: 10.1111/1574-6976.12057.

43. Drinka P. Does Biofilm Formation Play a Role in Ventilator-Associated Tracheobronchitis? Chest. 2009;136:1190-1191.

44. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI 2010. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Editora Savier 3ª edição. Capítulo 16 p.231-42.

45. Rello J, Gallego M, Mariscal D, Soñora R, Valles J. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:196–200.

46. Wu CL, Yang DI, Wang NY, Kuo HT, Chen PZ. Quantitative Culture of Endotracheal Aspirates in the Diagnosis of Ventilator-Associated Pneumonia in Patients with Treatment Failure. Chest 2002;122;662-668.

47. Michel F, Franceschini B, Berger P, Arnal JM, Gainnier M, Sainty JM, Papazian L. Early Antibiotic Treatment for BAL Confirmed Ventilator-Associated Pneumonia: A Role for Routine Endotracheal Aspirate Cultures. Chest. 2005;127:589-597.

48. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections A Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. Chest. 1999;115:462-474.

49. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic Treatment for Ventilator-Associated Pneumonia. Chest. 2002;122:262-268.

50. Ferrara AM. Treatment of hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicr Ag. 2007;30:19–24.

51. Lam AP, Wunderink RG. The Role of MRSA in Healthcare-Associated Pneumonia. Semin Respir Crit Care Med. 2009;30:52–60.

52. Fagon J-Y, Patrick H, Haas DW, Torres A, Gibert C, Cheadle WG, Falcone RE, Anholm JD, Paganin F, Fabian TC, Lilienthal F, Nosocomial Pneumonia Group.Treatment of Gram-positive Nosocomial Pneumonia Prospective Randomized Comparison of Quinupristin/Dalfopristin versus Vancomycin. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:753–762.

53. Aman MJ, Adhikari RP. Staphylococcal bicomponent pore-forming toxins: targets for prophylaxis and immunotherapy. Toxins (Basel). 2014;6:950-72.

Estudo do papel epidemiológico-molecular de *Staphylococcus aureus* no desenvolvimento de pneumonia associada à ventilação mecânica.

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo explorar a epidemiologia molecular de *S. aureus* isolados de pacientes sob ventilação mecânica e verificar a participação dos fatores de virulência no desenvolvimento da pneumonia. Foi realizado uma coorte prospectiva de pacientes nas primeiras 48 horas da ventilação mecânica com duas visitas semanais por até oito semanas para a coleta de aspirado traqueal e dados clínicos. Nos isolados de *S. aureus* foi traçado o perfil de resistência, virulência, expressão de proteína A e alfa toxina por Western Blot, o perfil clonal por PFGE, tipo sequencial por MLST, caracterização e quantificação de modulinas fenol solúvel (PSM). Análises de fatores de risco foram cruzadas com dados microbiológicos pela regressão de Poisson (backwards), foi calculado a incidência de PAV por *S. aureus*. De 270 pacientes no estudo foram isoladas 52 amostras de *S. aureus* de 47 pacientes. A incidência de PAV por *S. aureus* foi 2,35/ 1000 ventiladores-dia e por MRSA 1,96/ 1000 ventiladores-dia. 43% das amostras isoladas foram resistentes à oxacilina, 26% dessas apresentavam SCC*mec* tipo II e tipo IV isoladas de pacientes com PAV. Os fatores de virulência mais frequentes foram *icaA*, *hla* e *hld*. O perfil clonal revelou a presença de diversidade, prevalecendo STs de origem comunitária. Fatores de risco obtidos para o desfecho PAV foram a produção da PSMbeta 2, presença de neoplasia sólida e gene *sea*, e para o desfecho óbito foram a presença dos genes *sea* e *hlb*. Assim, fatores de risco do paciente em conjunto com fatores microbiológicos interferem no desenvolvimento da PAV por *S. aureus* sendo causada por cepas do próprio paciente.

Palavras no resumo: 263

Introdução

Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é um tipo de pneumonia nosocomial que afeta de 9 a 27% dos pacientes submetidos a ventilação mecânica (1,

6). A mortalidade atribuída a PAV varia de acordo com o grupo de risco estudado, onde pacientes cirúrgicos e de longa permanência estão mais sujeitos a evoluir para óbito (30). Dessa forma o estudo epidemiológico e molecular dos fatores relacionados ao desenvolvimento de PAV são de grande importância uma vez que pode ajudar a identificar os grupos de risco para criar novas intervenções.

Os agentes etiológicos mais frequentes de PAV são agentes bacterianos aeróbicos gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii* e *Klebsiella pneumoniae*. O principal agente de pneumonia nosocomial é a espécie *S. aureus* que ocupa o segundo lugar na participação em todas as infecções hospitalares (27).

Pneumonias causadas por MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) são geralmente difíceis de tratar e associadas a altas taxas de falha no tratamento (14). Cepas MRSA carreiam o gene *mec*A que confere resistência a antibióticos betalactâmicos e localizado em um elemento genético móvel (Staphylococcal cassete chromosomal *mec* – SCC*mec*) de tamanho e composições genéticas variáveis. A tipagem do SCC*mec* é muito utilizada para estudos epidemiológicos e pode ser útil para fins clínicos. Atualmente existem 11 tipos (I ao XI) (17) com a distribuição epidemiológica dividida em I ao III em hospitais e os outros tipos associados à comunidade. Estudo de Haque et al. (14) verificou que o SCC*mec* tipo II somado a fatores do hospedeiro está associado a mortalidade, ao alto MIC para vancomicina e à falha terapêutica clínica em pacientes com pneumonia hospitalar causada por MRSA. Tal achado demonstra a importância da pesquisa epidemiológico-molecular desses micro-organismos associados à PAV.

S. aureus possui ampla capacidade de invasão dos tecidos do hospedeiro devido aos diversos fatores de virulência. O papel que cada fator de virulência exerce na gravidade da pneumonia e/ou lesão pulmonar tem sido tema de diversos estudos que abordam desde a citotoxicidade bacteriana (42) até a exploração do papel de cada gene de virulência.

Dentre os fatores de virulência considerados importantes na pneumonia, a alfa hemolisina ou alfa toxina (geneticamente representada *hla*) é uma das mais proeminentes citotoxinas que tem como alvo eritrócitos, células epiteliais, endoteliais, células T, neutrófilos, monócitos e macrófagos. A alfa-toxina é uma molécula anfipática, hidrossolúvel e formadora de poros que se liga principalmente a lipídeos presentes na membrana da célula do hospedeiro (3). Sua função principal reside no estabelecimento da infecção sendo altamente inflamatória proporcionando uma congestão pulmonar (44).

Outros fatores como enterotoxinas (SEs) e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), são agentes superantigênicos envolvidos em diversas infecções humanas. No intuito de explorar sua participação na pneumonia, estudos experimentais realizados em coelhos revelam que a instilação intrapulmonar de SEB e SEC induzem hemorragia no tecido pulmonar, causando sintomas de angústia respiratória e síndrome do choque tóxico letal. Quando administradas cepas carreadoras dos genes para as mesmas enterotoxinas, observou-se patologia pulmonar e letalidade similar ao grupo no qual administraram-se as toxinas purificadas (45).

A participação da Leucocidina Panton-Valentine (PVL) em pneumonia tem sido extensivamente relatada na literatura especialmente em pneumonia causada por cepas de *S. aureus* de origem comunitária (22, 26). A PVL é uma toxina formadora de poros que tem como alvo neutrófilos e mitocôndrias. Atua na lise celular liberando agentes pro-inflamatórios no meio extracelular causando necrose tecidual e, quando presente no pulmão, está associada a pneumonia necrotizante (26, 31). Algumas cepas que carreavam o gene da PVL também apresentavam genes que codificam as esfoliatinas (*eta, etb* ou *etd*) (25). O papel das esfoliatinas é bem entendido em infecções de pele porém não em pneumonia, o que leva a necessidade da sua pesquisa em *S. aureus* associados à pneumonia.

Outro fator de virulência importante a ser estudado na patogenia da pneumonia por *S. aureus* é a formação de biofilme, principalmente na região do tubo endotraqueal. A produção do biofilme é mediada por produtos do gene cromossomal ica (intercelular adhesion) organizados em uma estrutura operon contendo os genes *icaADBC* (12) e pelo gene *bap* (10), proporcionando maior proximidade entre as bactérias facilitando o "quórum sensing". Assim, as bactérias recebem sinais químicos para se liberarem do biofilme ou para sintetizar outros fatores de virulência. (12).

Além de fatores bacterianos, fatores do hospedeiro para o desenvolvimento de PAV são amplamente estudados. O uso de antimicrobianos e antiácidos, optar por traqueostomia, a posição de supino, nutrição parenteral, a presença de AIDS, pertencer ao sexo masculino, apresentar doença pulmonar, coma, trauma são exemplos de fatores de risco para o desenvolvimento da PAV (4).

Assim, o objetivo do nosso estudo é explorar a epidemiologia molecular de *S. aureus* isolados de pacientes sob ventilação mecânica e verificar a participação dos fatores de virulência e do paciente no desenvolvimento da pneumonia.

2. METODOLOGIA

2.1 Local do estudo e casuística

O estudo foi realizado em duas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) que admitem pacientes adultos. As duas Unidades do Serviço Especializado de Terapia Intensiva (SETI), de 16 e 9 leitos internam pacientes clínicos e cirúrgicos. Os sujeitos foram incluídos obedecendo os seguintes critérios: pacientes sob Ventilação Mecânica (VM) iniciada nas 48 horas da admissão em UTI ou durante sua estadia, sem diagnóstico prévio de pneumonia e cuja família aceitou a participação no estudo através da aquisição do Termo de consentimento livre e esclarecido.

Trata-se de um estudo de coorte prospectiva tendo como desfecho primário de interesse a pneumonia associada à ventilação mecânica causada por *S. aureus* e o desfecho óbito por PAV.

Os sujeitos da pesquisa foram acompanhados por um período máximo de oito semanas de internação em UTI com acompanhamento realizado semanalmente em dois dias (segundas e quintas-feiras) com intervalo de 3,5 dias. Durante as avaliações foram coletados os dados clínicos e aspirado traqueal. O diagnóstico de PAV foi realizado por médico da comissão de controle de infecção relacionada à assistência em saúde (CCIRAS). Foram utilizados os critérios preconizados pelo National

Healthcare Safety Network (NHSN), do Center For Disease Control and Prevention® (CDC) dos Estados Unidos (16).

2.2 Coleta dedados clínicos

Na visita de inclusão do paciente foram obtidos os seguintes dados: sexo, idade, doenças de base e comorbidades, tempo de internação prévio à internação atual, procedimentos, presença de dispositivos invasivos (cateteres venosos centrais, sondas vesicais de demora, sondas nasogástricas/nasoenterais e drenos). Foram coletados alguns dados relacionados às duas semanas que precederem a VM: uso prévio e atual de antimicrobianos, intercorrências infecciosas anteriores e resultados de exames microbiológicos.

Nas avaliações de seguimento, foram coletados os dados de tempo de internação, procedimentos, dispositivos invasivos, utilização de antimicrobianos, intercorrências infecciosas e resultados de exames microbiológicos.

2.3 Coleta, Isolamento e Identificação Microbiana

A coleta do aspirado traqueal foi realizada por fisioterapeuta, médico ou enfermeira e imediatamente encaminhado para o Laboratório de Bacteriologia. O material clínico foi diluído 1:1 com N-acetil-Lcisteína (mucolítico) a 1%, homogeneizado e mantido por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, uma alíquota de 0,1ml dessa solução foi diluída em 9,9ml de solução fisiológica estéril e semeada com alça calibrada de 0,01ml em placas de Ágar Sangue de Carneiro e Baird Parker. Após incubação a 37º C por 24h as unidades formadoras de colônias (UFC)

foram determinadas multiplicando o número de colônias pela diluição correspondente (35). As culturas foram consideradas positivas a partir ou acima de 10^6 UFC. Os micro-organismos que se desenvolveram no meio de cultura foram submetidos à coloração de Gram e as amostras de cocos gram positivos foram submetidas às provas de catalase e coagulase. Posteriormente à confirmação da espécie as amostras foram conservadas em caldo nutriente com glicerol a -70°C.

2.4 Teste de sensibilidade antimicrobiana

Foram avaliados o perfil de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos de todas as amostras de *S. aureus* isoladas no estudo através do método de disco-difusão (Kirby-Bauer) com os discos de Gentamicina (10 µg), Linezolida (30µg), Penicilina G (10UN), Eritromicina (15µg), Clindamicina (2µg), e o teste de resistência induzida a clindamicina (teste D) conforme critérios recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (8). A sensibilidade à meticilina foi determinada pela utilização do disco de cefoxitina (30µg) e de oxacilina (1µg).

2.5 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* de todos os isolados de *S. aureus* foi avaliada para as drogas oxacilina, vancomicina, linezolida, daptomicina, quinupristina/dalfopristina e tigeciclina através do método de E-test. Os resultados do estudo das CIMs foram expressos por meio da proporção de amostras sensíveis a cada droga, de acordo com definição do CLSI (8). Amostras com valores intermediários foram consideradas resistentes.

2.6 Extração de ácido nucléico de *S. aureus*

O ácido nucléico foi extraído de todas as amostras de *S. aureus* isoladas no estudo. Os isolados foram previamente cultivados em ágar sangue e inoculados individualmente em caldo BHI e incubados a 37º C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante e o DNA extraído foi mantido a -20°C.

2.7 Detecção do gene *mecA*

Para detecção do gene *mecA* nas amostras de *S. aureus* isoladas foram utilizados os parâmetros e os primers descritos por Murakami et al (33). Nas reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

2.8 Classificação de SCC*mec* em *S. aureus*

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando o método de reação PCR-Multiplex com os primers e parâmetros descritos por Oliveira et al (35) e Milheiriço et al. (32) em todas as amostras de MRSA. Como controle para a tipagem do SCC*mec* foram utilizadas as cepas COL para SCC*mec* tipo I; N315 para SCC*mec* tipo IA; PER34 para o SCC*mec* tipo II; AN546 para o SCC*mec* tipo III; HU25 para o SCC*mec* tipo IIIA e MW2 para o SCC*mec* tipo IV.

2.9 Detecção dos genes de fatores de virulência

A detecção dos fatores de virulência em todas as amostras de *S. aureus* isoladas foi realizada através da técnica de PCR utilizando primers e parâmetros conforme descritos na Tabela 1, incluindo a pesquisa de genes da Leucocidina Panton-Valentine (*lukS – lukF-PV*), Toxina da Síndrome do Choque tóxico (*tst*), Enterotoxinas Estafilocócicas A a C (*sea, seb* e *sec*), biofilme (genes *icaA, icaD* e *bap*) esfoliatinas A e B (*eta* e *etb*) e hemolisinas α, β e δ (*hla, hlb* e *hld*). Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Detecção dos genes que codificam os fatores de virulência em *S. aureus.*

Genes	bp	Controle positivo	Referências
sea	120	ATCC 13565	Johnson et al (19) Cunha et al (11)
seb	478	ATCC 14458	Johnson et al (19) Cunha et al (11)
sec-1	257	ATCC 19095	Johnson et al (19) Cunha et al (11)
tst	350	ATCC 51650	Johnson et al (19) Cunha et al (11)
lukPV	433	ATCC 49775	Lina et al (26)
icaA	600	ATCC 35556	Rohde et al (41)
icaD	450	ATCC 35556	Arciola et al (2)
Bap	220	*Nenhum*	Cucarella et al (10)
eta	119	ZM	Jarraud et al (18)
etb	200	N5	Jarraud et al (18)
hla	209	N315	Jarraud et al (18)
hlb		RN4220	Jarraud et al (18)
hld	357	ATCC 19095	Marconi et al (28)

bp: pares de base

2.10 Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão TBE 1,0 X e corado com Sybr Safe. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o marcador de peso molecular de 100 bp e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

2.11 Caracterização e quantificação de modulinas fenol solúveis (PSM's) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para detecção e quantificação de PSMs, 10µl de uma cultura overnight foi cultivada em 1 ml de TSB (Tryptic Soy Broth) por 16 a 18 horas e centrifugada a 14000 rpm por 15 min a 4ºC e 300µl do sobrenadante foi reservado para análise em RP-HPLC/MS (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography mass spectometry) como descrito anteriormente (20). Os dados foram analisados no software GraphPrism (GraphPad Software).

2.12 Western Blot para quantificação da expressão de *spa* e *hla*

Para análise da expressão de proteína A e *hla* as cepas foram cultivadas overnight e 10µl dessa cultura foi adicionada em 1ml de TSB e cultivada a 37º C por 8 horas. As culturas foram centrifugadas e uma alíquota de 300µl do sobrenadante foi utilizada para as análises em Western Blot seguindo o protocolo do kit Life Technologies (IB301 1001).

2.13 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A tipagem por PFGE foi realizada por meio da digestão do DNA cromossômico pela enzima de restrição *SmaI* para as amostras de *S. aureus* associadas à PAV. A preparação dos plugues e os parâmetros foram definidos por McDougal et al (29). Os fragmentos de restrição resultantes da digestão com a enzima *SmaI* foram submetidos a eletroforese no sistema CHEF-DRIII (Bio-RadLaboratories, EUA) com pulsos alternando de 5 a 60 segundos a 6 V/cm e temperatura de 13º C durante 23 horas em gel de agarose para PFGE a 1%.

Os géis foram corados com Gel Red (Biotium) por uma hora, descorados em água Milli Q por mais uma hora e fotografados sob transiluminação UV. Os perfis foram analisados no software BioNumerics (Applied Maths) utilizando o coeficiente de restrição Dice e método UPGMA (tolerância 1.2 e otimização de 1%) para clusterização das amostras. Para definição de cluster foi utilizada similaridade maior ou igual a 80%. Os clones internacionais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari, Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina e Dra. Agnes Marie Sá Figueiredo, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

2.14 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Os genes constitutivos de *S. aureus* associados à PAV foram amplificados e sequenciados para determinar a composição alélica e estabelecer o ST (sequence type) utilizando parâmetros propostos por Enright et al (13) dos 7 housekeeping

genes *arcC, aroE, yqiL, gmk, tpi, glp e pta*. O sequenciamento foi realizado pela Macrogen (EUA) e analisadas pelo software SeqBuider® e site oficial mlst.org.

2.15 Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas através da regressão de Poisson com seleção por backwards (o primeiro modelo inclui todas as variáveis, e no modelo multivariado incluem-se as variáveis com p>0,1 retirando uma a uma, iniciando pelas variáveis de maior valor de p, incluindo somente aquelas com p<0,1, ou seja, as significantes e as "marginalmente significantes") dos fatores do hospedeiro e microbiológicos para estabelecer relação ao desenvolvimento de PAV e óbito. Os valores obtidos para a produção de modulinas, alfa-toxina e proteína A (*spa*) foram dicotomizados pela mediana para inclusão no modelo (valor igual ou maior que a mediana era sim, valor menor era não). Os dados foram armazenados nos softwares Epi Info® (versão 3.5.2, Center for Disease Control and Prevention) e Excell e analisados pelo software Epi Info e SPSS®. Foi calculado a densidade de incidência (DI) de PAV por *S. aureus* e MRSA utilizando a seguinte equação.

$$DI = \frac{NPAV * 1000}{\Sigma nVis * 3{,}5}$$

Onde: DI= densidade de incidência, NPAV =número de pacientes com o desfecho PAV, 1000 = coeficiente padrão, ΣnVis= somatória do número de visitas dos pacientes (728), 3,5= número de dias de intervalo entre as visitas.

3. Resultados

3.1 Isolamento e identificação microbiana

De um total de 270 pacientes no período de estudo (Novembro 2011 a Agosto de 2013) foram isoladas 52 amostras de *S. aureus* de 47 pacientes, das quais 11 foram recuperados de pacientes com PAV, onde 55% foram MSSA e 45% MRSA. A incidência de PAV por *S. aureus* nesse estudo foi de 2,35 por 1000 ventiladores dia e de PAV por MRSA de 1,96 por 1000 ventiladores dia.

3.2 Detecção do gene *mec*A, tipagem do cassete cromossômico e resistência antimicrobiana

O gene *mec*A foi detectado em 43%(23/53) das amostras de *S. aureus* isoladas sendo que 21% (5/23) foram isoladas de pacientes com PAV. O tipo de cassete mais frequente no total de *S. aureus* estudados foi SCC*mec* tipo II (78%) seguido do tipo IV (17%) e tipo I (4%), sendo que nas amostras de *S. aureus* associadas à PAV foram encontradas dois com SCC*mec* tipo II e três com *SCCmec* tipo IV.

A determinação da CIM pelo E-test nas amostras de *S. aureus* revelou que nenhuma das amostras apresentou CIM acima de 1,5µg/ml para vancomicina. Todas as amostras foram sensíveis a quinupristina-dalfopristina, tigeciclina, linezolida e daptomicina pelo E-test. O método de disco-difusão revelou que 81% das amostras foram resistentes a penicilina, 58% à eritromicina, 54% à clindamicina, 13% foram positivas para o teste D, 39% à oxacilina e 39% à cefoxitina. Dentre as amostras positivas para o gene *mec*A, 78% (18/23) foram adicionalmente resistentes à

eritromicina e à clindamicina, com perfil multirresistente e nenhuma cepa MRSA foi positiva para o teste D. Todas as amostras foram sensíveis à gentamicina. As CIM50 e CIM90 para as drogas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação da CIM pelo método de E-test em *S. aureus.*

Antimicrobiano	Intervalo de variação CIM	Percentagem Sensibilidade (%)	CIM 50	CIM 90
Oxacilina	0,016->256	55	0,5	>256
Vancomicina	0,125 - 1,5	100	0,75	1,5
Quinupristina-Dalfopristina	0,094 - 0,75	100	0,38	0,75
Tigeciclina	0,047 – 0,94	100	0,094	0,125
Linezolida	0,19-1,5	100	0,75	1
Daptomicina	0,016 – 0,47	100	0,094	0,125

CIM: Concentração inibitória mínima
CIM 50: Concentração inibitória mínima que inibe 50% dos micro-organismos isolados
CIM 90: Concentração inibitória mínima que inibe 90% dos micro-organismos isolados

3.3 Fatores de virulência em amostras de *S. aureus*

Dentre os fatores de virulência pesquisados, a presença de genes associados à produção de biofilme (*ica*A), e de hemolisinas *hla* e *hld* estiveram presentes em maior frequência, seguidos pelos genes *icaD* e *hlb* (Tabela 2). Não houve associação estatística significativa em relação a presença do gene *mec*A e fatores de virulência. Observou-se que amostras positivas para o gene *mecA* apresentaram uma frequência ligeiramente maior da presença dos genes *sea, sec, icaC e hlb* em comparação às amostras negativas para o gene, porém não apresentando associação estatística.

Tabela 2. Frequência de genes de virulência e associação entre a presença do gene *mec*A

Genes de virulência	Total (%)	*mec*A		p
		Positivo N (%)	Negativo N (%)	
hla	53 (100)	23 (100)	30 (100)	1
hld	53 (100)	23 (100)	30 (100)	1
icaA	53 (100)	23 (100)	30 (100)	1
icaD	44 (83)	19 (82)	25 (83)	0,08
hlb	18 (34)	9 (39)	9 (30)	0,48
sea	17 (32)	5 (21)	12 (10)	0,15
sec	10 (19)	5 (21)	5 (16)	0,21
icaC	6 (11)	4 (17)	2 (6)	0,61
tst	1 (2)	0	1 (3)	0,89
pvl	1 (2)	0	1 (3)	0,89
eta	0	0	0	--
etb	0	0	0	--
seb	0	0	0	--
bap	0	0	0	--

3.4 Caraterização clonal das amostras de *S. aureus*

A análise do perfil clonal de *S. aureus* isolados de pacientes com PAV pela técnica de PFGE revelou um perfil policlonal (Figura 1). Os STs mais frequentes foram ST105, ST5 e ST398. As únicas amostras agrupadas foram aquelas isoladas do mesmo paciente em um período anterior ao desenvolvimento da pneumonia com exceção de um paciente (166) que apresentou um perfil diferente na segunda coleta carreando SCC*mec* IV, porém pertencente ao mesmo ST5 da primeira amostra (Figura 1). A comparação dessas cepas com cepas controle internacionais revelou o agrupamento de uma cepa de *S. aureus* desse estudo (129-2) com o clone

internacional USA 300 com 85% de similaridade. Duas amostras (47 e 239-10) agruparam com 81.8% de similaridade, pertencentes ao mesmo ST 105, SCC*mec* II. As características moleculares das amostras estão dispostas na tabela 7 e a caracterização das PSMs nas amostras de pacientes com PAV estão dispostas na figura 2

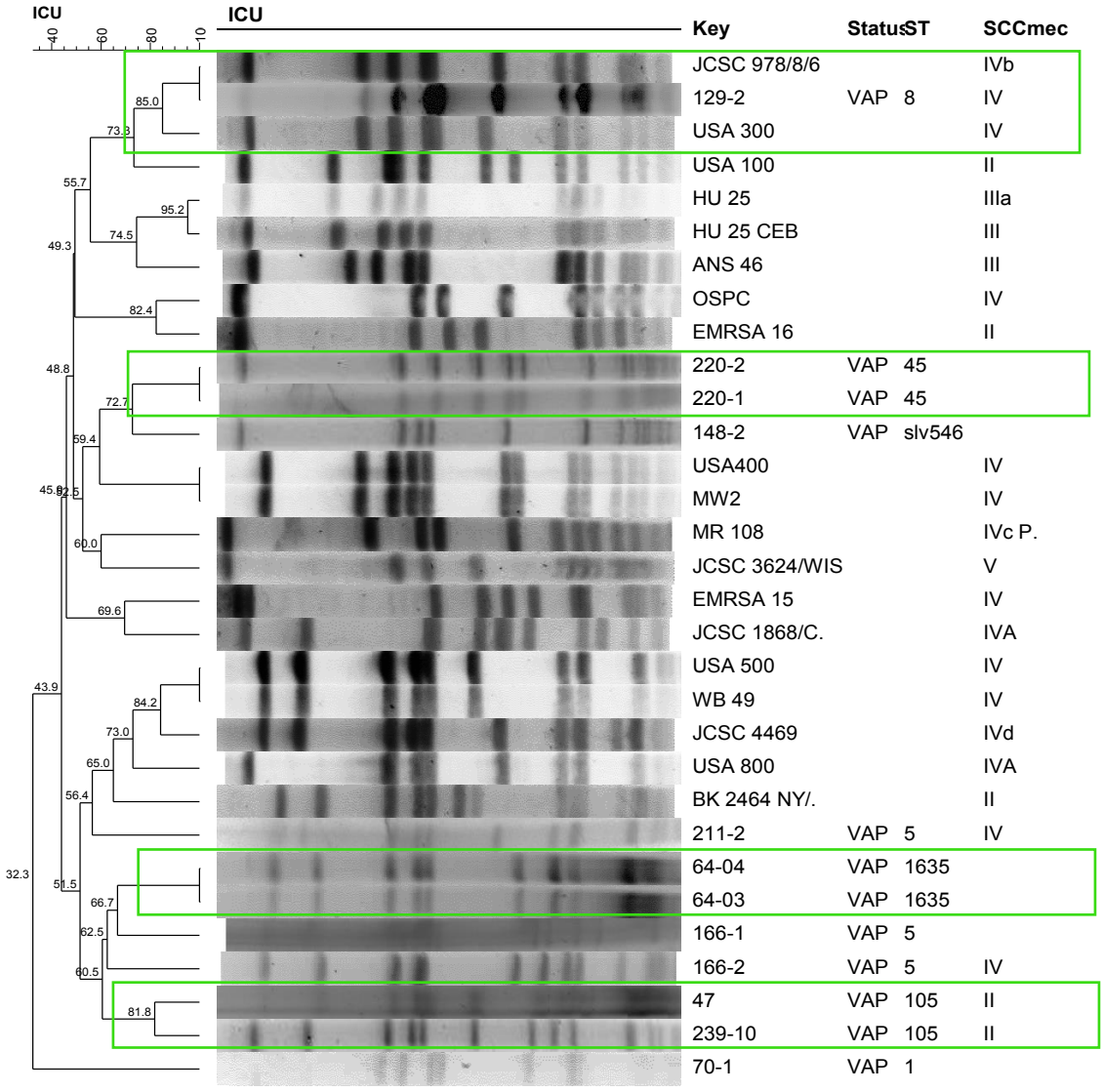

Figura 1. Clusterização das amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes com PAV tipadas por PFGE.

Tabela 7. Características das amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes com PAV.

Número	ST	*mecA*	SCC*mec*	Genes de virulência	Alfa toxina	spa
47	105	+	II	*hla/hlb/hld/icaA/icaD/sea*	24373527	9767104
54	398	-		*hla/hld/icaA/icaD/sea*	76362660	0
64	1635	-		*hla/hlb/hld/icaA/icaD*	0	32265275
70	1	-		*hla/hlb/hld/sea/icaA/icaD*	6982199	21823765
97	398	-		*hla/hld/sea/sec/icaA/icaD*	41033870	455862
129	8	+	IV	*hla/hld/sea/icaA/icaD*	38447276	1576784
148	slv 546	-		*hla/hld/sec/icaA*	41687067	0
166	5	-		*hla/hld/sea/sec/icaA/icaD*	7356952	10672368
166	5	+	IV	*hla/hld/icaA*	0	0
211	5	+	IV	*hla/hld/icaA/icaD*	0	28944479
220	45	-		*hla/hlb/hld/sea/icaA/icaD*	0	0
220	45	-		*hla/hlb/hld/sea/icaA*	1939185	73614614
239	105	+	II	*hla/hlb/hld/icaA/icaD*	6919452	9918149

ST: sequence type
SLV: Single locus variant
Spa: proteína A

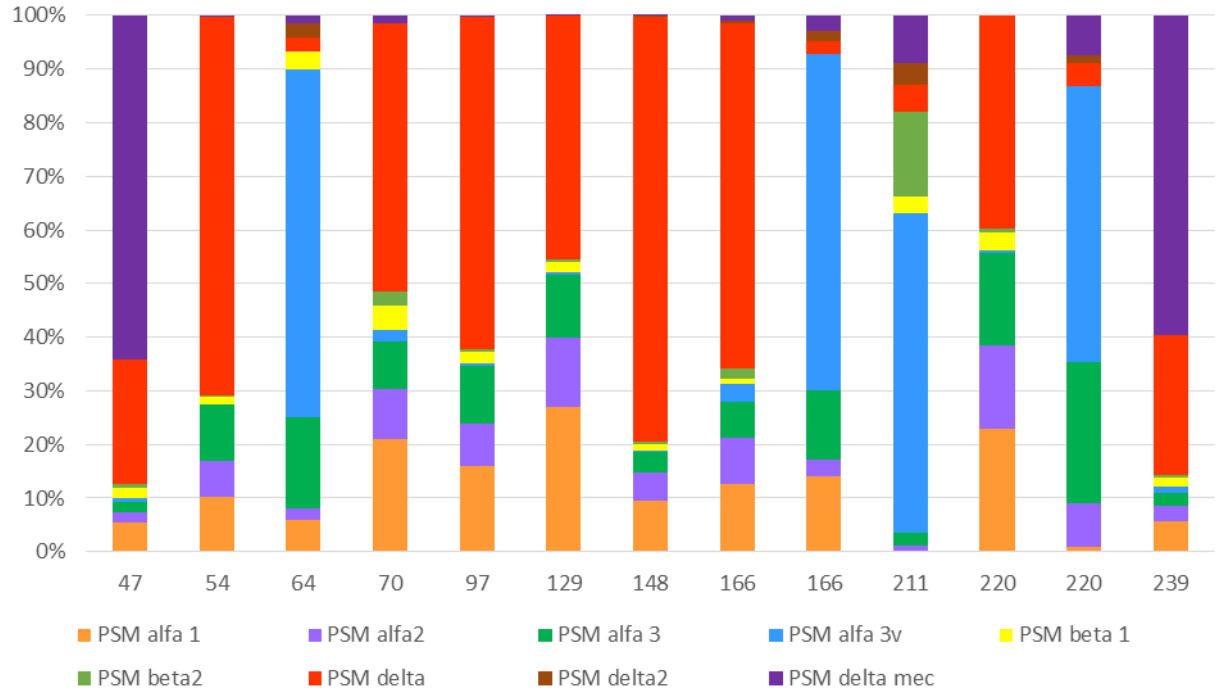

Figura 2. Caracterização das modulinas fenol solúveis (PSM) nas amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes com PAV. PSM alfa 3v: PSM alfa 3 variante; PSMdelta mec: PSM presente no SCCmec II.

3.5 Fatores de risco

O Modelo de Regressão de Poisson para análise dos fatores do hospedeiro e microbiológicos para desenvolvimento de PAV por *S. aureus* revelou na análise univariada a associação positiva dos genes *sea*, *ica*C e modulina PSMbeta2, enquanto a presença de doença do Sistema Nervoso Central foi fator negativamente associado. No entanto, na análise multivariada os únicos fatores independentes associados positivamente ao desfecho PAV causada por *S. aureus* foram a presença do gene *sea*, produção igual ou maior que a mediana obtida para a modulina PSMbeta2 e neoplasia sólida. A produção da alfa-toxina foi associada negativamente ao desenvolvimento de PAV (tabela 8).

Tabela 8. Modelo de Regressão de Poisson para análise dos fatores do hospedeiro e microbiológicos para desenvolvimento de PAV por *S. aureus*.

Fatores de risco	**Univariada** RR (IC 95%)	P	**Multivariada (modelo final)** RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	1,91 (0,68-5,30)	0.2		
Idade	0,99 (0,98-1,02)	0.9		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardíaca	1,30 (0,74-2,29)	0.4		
Doença pulmonar	0,74 (0,27-2,07)	0.6		
Doença renal	0,87 (0,41-1,85)	0.7		
Doença hepática	2,28 (0,82-6,34)	0.1		
Doença do Sistema Nervoso Central	**0,50 (0,26-0,97)**	**0.04**		
Neoplasia sólida	1,99 (0,92-4,24)	0.08	**2,51 (1,08-5,88)**	**0.03**
Aids	1,68 (0,61-4,69)	0.3		
Diabetes mellitus	1,16 (0,55-2,50)	0.7		
Trauma	0,81 (0,29-2,26)	0.7		
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora	1,16 (0,42-3,25)	0.8		
Cateter Venoso Central	0,69 (0,38-1,26)	0.2		
Cirurgia	0,74 (0,42-1,31)	0.3		
Uso de esteróides	0,52 (0,19-1,45)	0.2		

(Continuação)

Fatores de risco	**Univariada** RR (IC 95%)	P	**Multivariada (modelo final)** RR (IC 95%)	P
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos	...*	...*		
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1,05 (0,59-1,86)	0.9		
Outros beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas)	1,27 (0,71-2,25)	0.4		
Glicopeptídeos	0,58 (0,21-1,61)	0.3		
Quinolonas	0,00 (0,00-...)	1		
Polimixinas	0,00 (0,00-...)	1		
Macrolideos	1,39 (0,50-3,87)	0.5		
Sulfas	...*	...*		
Anaerobicidas	0,00 (0,00-...)	...*		
Categoria 6: resistência e virulência				
*mec*A	1,21 (0,69-2,14)	0.5		
SCC*mec*				
Ausente (referência)	...	...		
SCCmec I	0,00 (0,00-...)	1		
SCCmec II	0,00 (0,00-...)	1		
SCCmec III	39,80 (0,00-...)	1		
SCCmec IV	200,04 (0,00-...)	1		
pvl	0,00 (0,00-...)	1		
tsst-1	0,00 (0,00-...)	1		
hla	4756,52 (0,00-...)	1		
hlb	1,25 (0,70-2,22)	0.4		
hld	0,95 (0,34-2,64)	0.9		
etA	...*	...*		
etB	...*	...*		
sea	**2,07 (1,17-3,69)**	**0.01**	**1,88 (1,04-3,41)**	**0.04**
seb	...*	...*		
sec	1,10 (0,57-2,11)	0.8		
bap	...*	...*		
icaA	...*	...*		
icaC	**1,92 (1,00-3,69)**	**0.049**		
icaD	10527 (0,00-...)	1		
*PSM_alfa 1***	1,08 (0,50-1,32)	0.8		
*PSM_alfa2***	1,27 (0,69-2,31)	0.4		
*PSM_alfa3***	1,86 (0,97-3,57)	0.06		
*PSM_alfa3v***	1,01 (0,57-1,77)	0.9		
*PSM_alfa4***	1,27 (0,69-2,29)	0.5		
*PSM_beta1***	1,03 (0,58-1,82)	0.9		

Continuação

Fatores de risco	Univariada RR (IC 95%)	P	Multivariada (modelo final) RR (IC 95%)	P
*PSM_beta2***	**2,33 (1,09-4,98)**	**0.03**	**3,19 (1,41-7,20)**	**0.005**
*PSM_delta***	0,91 (0,52-1,60)	0.7		
*PSM_delta2***	0,92 (0,52-1,62)	0.8		
*PSM_delta mec***	0,93 (0,52-1,65)	0.8		
*alfa toxin***	0,71 (0,40-1,26)	0.2	**0,39 (0,19-0,77)**	**0.006**
*spa***	1,30 (0,73-2,31)	0.4		

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança.

** Impossibilidade de análise por valor igual em todos os sujeitos.*

*** Valores dicotomizados na mediana.*

Em relação ao desfecho óbito em pacientes com PAV causada por *S. aureus* o Modelo de Poisson revelou na análise univariada a associação positiva de doença hepática e presença do gene *sea*, enquanto a presença de cateter venoso central foi negativamente associada. No entanto, na análise multivariada, os únicos fatores independentes associados positivamente ao desfecho óbito foram a presença dos genes *sea* e *hlb* (tabela 9).

Tabela 9. Modelo de Regressão de Poisson para análise dos fatores do hospedeiro e microbiológicos para o desfecho óbito em pacientes com PAV por *S. aureus*. (continuação na próxima página)

Fatores de risco	Univariada RR (IC 95%)	P	Multivariada (modelo final) RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	5063 (0,00-...)	1		
Idade	0,99 (0,96-1,03)	0.9		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardíaca	1,10 (0,45-2,70)	0.8		
Doença pulmonar	0,00 (0,00-...)	1		
Doença renal	0,97 (0,33-2,92)	0.9		
Doença hepática	**3,63 (1,21-10,85)**	**0.02**		
Doença do Sistema Nervoso Central	0,48 (0,16-1,44)	0.2		

Continuação

Fatores de risco	**Univariada** RR (IC 95%)	P	**Multivariada (modelo final)** RR (IC 95%)	P
Neoplasia sólida	0,00 (0,00-...)	1		
Aids	2,66 (0,89-7,96)	0.08		
Diabetes mellitus	1,24 (0,41-3,71)	0.7		
Trauma	1,43 (0,48-4,28)	0.5		
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora	0,66 (0,222-1,99)	0.5		
Cateter Venoso Central	**0,39 (0,16-0,97)**	**0.04**		
Cirurgia	0,43 (0,14-1,29)	0.1		
Uso de esteróides	0,88 (0,30-2,65)	0.8		
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos	....*	....*		
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1,56 (0,64-3,18)	0.3		
Outros beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas)	0,51 (0,17-1,51)	0.2		
Glicopeptídeos	0,97 (0,33-2,92)	0.9		
Quinolonas	0,00 (0,00-...)	1		
Polimixinas	0,00 (0,00-...)	1		
Macrolideos	2,05 (0,69-6,14)	0.2		
Sulfas	...*	...*		
Anaerobicidas	0,00 (0,00-...)	...*		
Categoria 6: resistência e virulência				
*mec*A	0,92 (0,38-2,25)	0.9		
SCC*mec*				
Ausente (referência)	...	...		
SCCmec I	0,00 (0,00-...)	1		
SCCmec II	4021,00 (0,00-...)	1		
SCCmec III	...*	...*		
SCCmec IV	0,00 (0,00-...)	1		
pvl	0,00 (0,00-...)	1		
tsst-1	0,00 (0,00-...)	1		
hla	2910,00 (0,00-...)	1		
hlb	1,89 (0,77-4,63)	0.2	**3,85 (1,43-10,32)**	**0.007**
hld	4188,26 (0,00-...)	1		
etA	...*	...*		
etB	...*	...*		
sea	**3,24 (1,08-9,67)**	**0.04**	**6,58 (1,86-23,38)**	**0.003**
seb	...*	...*		
sec	1,40 (0,51-3,42)	0.5		
BAP	...*	...*		
icaA	...*	...*		
icaC	1,62 (0,54-4,85)	0.4		
icaD	6358,39 (0,00-...)	1		

Continuação

Fatores de risco	**Univariada** RR (IC 95%)	P	**Multivariada (modelo final)** RR (IC 95%)	P
*PSM_alfa 1***	1,18 (0,48-2,89)	0.7		
*PSM_alfa2***	1,06 (0,43-2,59)	0.9		
*PSM_alfa3***	2,04 (0,68-6,09)	0.2		
*PSM_alfa3v***	0,48 (0,16-1,43)	0.2		
*PSM_alfa4***	1,05 (0,43-2,57)	0.9		
*PSM_beta1***	1,13 (),46-2,76)	0.8		
*PSM_beta2***	1,95 (0,65-5,84)	0.2		
*PSM_delta***	0,79 (0,32-1,94)	0.6		
*PSM_delta2***	0,43 (0,14-1,28)	0.1		
*PSM_delta mec***	1,33 (0,55-3,27)	0.4		
*alfa toxin***	0,73 (0,30-1,80)	0.5		
*spa***	1,26 (0,52-3,09)	0.6		

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança.

** Impossibilidade de análise por valor igual em todos os sujeitos*

*** Valores dicotomizados na mediana.*

1

4. Discussão

Pneumonias nosocomiais são o primeiro tipo de infecção hospitalar, junto com infecção de sitio cirúrgico, onde *S. aureus* é o principal agente etiológico segundo inquérito realizado nos EUA (27). O presente estudo verificou que a densidade de incidência de PAV por *S. aureus* foi de 2,35 por 1000 ventiladores-dias, valor superior ao encontrado no estudo de Lee et al (23), com DI de PAV de 1,4 por 1000 ventiladores-dia onde o micro-organismo mais isolado foi *S. aureus*.

A presença do gene *mec*A, resistência à oxacilina e tipos de SCC*mec* não foram associados ao desenvolvimento de PAV ou ao desfecho óbito no nosso estudo. Em alguns estudos a infecção por cepas resistentes à meticilina está associada a longa permanência em UTI e a maiores taxas de mortalidade em comparação aos pacientes que desenvolvem PAV por MSSA (40). Porém, outros estudos (9, 24, 48) relatam que a resistência à meticilina por si só não esteve associada à recorrência, gravidade e mortalidade em PAV por *S. aureus* (48). Assim, a resistência à meticilina parece ser um fator que não interfere na taxa de mortalidade em PAV, o que gera a especulação sobre outros fatores em cepas hospitalares que podem contribuir para a mortalidade.

Interessantemente, as amostras positivas para o gene *mec*A apresentaram uma frequência ligeiramente maior da presença dos genes *ica*C, *sec*, *sea* e *hlb*, no entanto não houve associação estatística significativa entre a presença simultânea dos genes *mec*A e dos genes de virulência, sendo que as cepas MSSA e MRSA apresentam o mesmo nível de virulência.

A grande variabilidade dos perfis clonais encontrados entre as cepas isoladas de pacientes com PAV e seu agrupamento somente para o mesmo indivíduo, sugere

que essas cepas sejam endógenas e que seu desenvolvimento ocorre a partir de cepas que já colonizam o paciente. Somente duas amostras (47 e 239) agruparam entre si, pertencentes ao mesmo clone. Estudos anteriores verificaram que o padrão de colonização varia conforme o micro-organismo, sendo que os gram-positivos colonizam a traqueia durante as primeiras 24 horas da ventilação mecânica e posteriormente são substituídos pela colonização por gram-negativos e leveduras (5).

Os STs característicos de ambientes comunitários foram os mais isolados de pacientes que desenvolveram PAV (ST45, ST5, ST8, ST1635, ST398, SLV 546) com exceção do clone ST105 característico de hospitais carreando o SCC*mec* II. Uma amostra foi agrupada com o USA300 e pertencente ao mesmo ST8 carreando o SCC*mec* IV, negativa para o gene da PVL. Os relatos clássicos de infecção por USA 300 são principalmente de pneumonia necrotizante (46) em indivíduos saudáveis da comunidade, sem fatores tradicionais para aquisição de MRSA (21). Apesar dos relatos da pneumonia em pacientes na comunidade, recentemente Pasquale et al (38) relataram o envolvimento de USA300 em pneumonias nosocomiais, onde a participação dessas cepas é de grande importância clínica, pois além da dificuldade na seleção de antimicrobianos para o tratamento, essas cepas podem carrear uma ampla gama de fatores de virulência o que pode também influenciar no desfecho (30).

A presença de STs característicos de ambientes comunitários envolvidos em infecções hospitalares, especialmente o ST8 associado a surtos de infecções de difícil tratamento (43). Tal observação direciona a atenção para a necessidade de controle de transmissão dessas cepas de origem comunitária entre pacientes da mesma UTI.

A participação de fatores de virulência no desenvolvimento da PAV tem sido discutida com o objetivo de encontrar um marcador que possibilite predizer o desenvolvimento e gravidade dessas infecções. A participação de um único fator de virulência, como a alfa-hemolisina e a proteína A, estão bem estabelecidos na literatura como fatores importantes, se não cruciais, no estabelecimento da pneumonia (47).

Verificamos que a maior produção da modulina PSM beta 2, a presença de neoplasia sólida e a presença do gene *sea* apresentaram associação positiva ao desfecho PAV. Em geral as modulinas atuam na invasão tecidual por sua característica anfipática e se comportarem como surfactantes (7). Estudo anterior também verificou que pacientes com neoplasia, especialmente a neoplasia pulmonar, estão sob risco aumentado de desenvolver PAV em comparação a outros pacientes (37).

A presença de *sea* nos pulmões pode provocar uma resposta inflamatória através da produção de IFN-γ por células T CD8 levando a lesões características da síndrome do estresse respiratório agudo (ARDS) (34) o que sugere que cepas produtoras dessa enterotoxina oferecem risco no desenvolvimento de pneumonia associados a sintomas graves.

A associação negativa da alfa-toxina no desenvolvimento da PAV encontrado na análise estatística é um resultado intrigante, visto que a utilização de modelos biológicos experimentais revelam correlação entre expressão dessa toxina e gravidade da doença (dados não apresentados), o que sugere que da forma como esse dado foi inserido no modelo pode não ter permitido verificar o efeito. Conforme

descrito na metodologia, os valores obtidos da produção de alfa-toxina foram dicotomizados pela mediana para inclusão no modelo (valor igual ou maior que a mediana era sim, valor menor era não), e a inclusão dos dados dessa forma no modelo, pode não ter permitido assumir proposições corretas, inclusive pelo fato de ser um produto biológico que pode apresentar resultados diferentes com relação aos efeitos dose-resposta ou esse efeito pode estar associado ao tipo de ST, com a produção de alfa-toxina sendo mais importante em algumas cepas do que em outras para a instalação da pneumonia, ou mesmo outros fatores de virulência inseridos no modelo que podem ter sido possíveis variáveis de confusão.

Os únicos fatores independentes associados ao desfecho óbito foram a presença dos genes *sea* e *hlb*. A presença da enterotoxina A pode estar associada a uma infecção de característica agressiva (34). De forma similar, a presença da *hlb* em tecido pulmonar pode aumentar a infiltração de neutrófilos através da modulação de fatores do hospedeiro o que contribui para a instalação da pneumonia (15). Ambos fatores associados a óbito são conhecidos por ativar uma resposta imunológica intensificada, podendo contribuir para dificuldade ventilatória o que poderia levar a morte do paciente de forma rápida.

A associação da presença de genes de virulência no desenvolvimento da PAV são pouco explorados, limitando-se a análise de fatores como citotoxicidade da cepa (42) ou de poucos fatores de virulência em experimentos animais (47) o que oferece uma excelente perspectiva biológica dos fatores de virulência estudados. No entanto, nosso estudo oferece uma visão prática dos fatores de virulência e trouxe novas perspectivas em relação à associação dos fatores microbiológicos com o desfecho

PAV. Assim, verificamos que a PAV é multifatorial em relação à microbiologia e a fatores de risco do próprio hospedeiro.

Os principais pontos fortes desse estudo são que os pacientes foram acompanhados desde o momento da intubação permitindo o estudo microbiológico ao e dos dados clínicos ao longo de todo o período para análise no desenvolvimento da PAV. Assim, os resultados permitem sugerir que a PAV em pacientes internados em UTI é causada principalmente por cepas de *S. aureus* que já colonizam esses pacientes, dado esse suportado pelos STs encontrados que são característicos de cepas encontradas na comunidade, e que exibem fatores de virulência importantes no desenvolvimento da PAV e no desfecho óbito de pacientes.

5. Referencias[1]

1. **American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America**. 2005. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med **171**(4):388-416.

2. **Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassari L, Montanaro L.** 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of ica locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. J Biomed Mater Res A **75**:408-413.

3. **Berube BJ, BubeckWardenburg J.** 2013. *Staphylococcus aureus* α-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins (Basel) **5**:1140-66.

4. **Bonten MJM, Kollef MH, Hall JB.** 2004. Risk Factors for Ventilator-Associated Pneumonia: From Epidemiology to Patient Management. Clinical Infectious Diseases **38**:1141–9.

5. **Cardeñosa Cendrero JA1, Solé-Violán J, Bordes Benítez A, Noguera Catalán J, Arroyo Fernández J, Saavedra Santana P, Rodríguez de Castro F.** 1999. Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation. Chest **116**(2):462-70.

6. **Chastre J, Fagon JY**. 2002. Ventilator -associated Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med **165**:867–903.

7. **Cheung GY, Joo HS, Chatterjee SS, Otto M.** 2014. Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. FEMS Microbiol Rev **38**:698-719. doi: 10.1111/1574-6976.12057.

8. **CLSI.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2014.

9. **Combes A, Luyt CE, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre J.** 2009. Gender impact on the outcomes of critically ill patients with nosocomial infections. Crit Care Med **37**(9):2506-11. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181a569df.

10. **Cucarella C, Tormo MA, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR.** 2004. Role of Biofilm –Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. Infect Immu **72**: 2177-2185.

11. **Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Jr JP.** 2006. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. Braz J Microbiol **37**:64-69.

[1] Referências formatadas de acordo com o periódico Journal of Clinical Microbiology.

12. **Drinka P.** 2009. Does Biofilm Formation Play a Role in Ventilator-Associated Tracheobronchitis? Chest **136**:1190-1191.

13. **Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **38**:1008-15.

14. **Haque NZ, Arshad S, Peyrani P, Ford KD, Perri MB, Jacobsen G, Reyes K, Scerpella EG, Ramirez JA, Zervos MJ.** 2012. Analysis of pathogen and host factors related to clinical outcomes in patients with hospital-acquired pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **50**(5):1640-4. doi: 10.1128/JCM.06701-11.

15. **Hayashida A, Bartlett AH, Foster TJ, Park PW.** 2009. *Staphylococcus aureus* Beta-Toxin Induces Lung Injury through Syndecan-1. The American Journal of Pathology 174(2):509-518.

16. **Horan TC, Andrus M, Dudeck MA.** 2008. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control **36**:309-32.

17. **IWG-SCC.** International working group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements. Web page on the internet. Accessed jun 17, 2015. Available: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html

18. **Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immu **70**:631-641.

19. **Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR.** 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology **29**:426-430.

20. **Joo HS, Otto M.** 2014. The isolation and analysis of phenol-soluble modulins of *Staphylococcus epidermidis*. Methods Mol Biol **1106**: 93-100.

21. **King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM.** 2006. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft tissue infections. Ann Intern Med. **144**:309–317.

22. **Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P.** 2011. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. Annals of Intensive Care **1**:52. doi:10.1186/2110-5820-1-52.

23. **Lee MS, Walker V, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ.** 2013. The Epidemiology of Ventilator-Associated Pneumonia in a Network of Community Hospitals: A Prospective Multicenter Study. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America **34**(7):657-662. doi:10.1086/670991.

24. **Lentino JR, Hennein H, Krause S, Pappas S, Fuller G, Schaaff D, DiCostanzo MB.** 1985. A comparison of pneumonia caused by gentamicin, methicillin-resistant and gentamicin, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: epidemiologic and clinical studies. Infect Control 6(7):267-72.

25. **Liassine N, Auckenthaler R, Descombes MC, Bes M, Vandenesch F, Etienne J**. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. J Clin Microbiol **42**(2):825-8.

26. **Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J.** 1999. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clinical Infectious Diseases **29**:1128–32.

27. **Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, et al. 2014** Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med **370**(13):1198-208.

28. **Marconi C, Cunha MLRS, Araujo Jr JP, Rugolo LMSS.** 2004. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus* spp. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis **11**:117-28.

29. **McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC.** 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. J Clin Microb **41**: 5113–5120.

30. **Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RH, Bergmans DC, Camus C, Bauer TT, Hanisch EW, Klarin B, Koeman M, Krueger WA, Lacherade JC, Lorente L, Memish ZA, Morrow LE, Nardi G, van Nieuwenhoven CA, O'Keefe GE, Nakos G, Scannapieco FA, Seguin P, Staudinger T, Topeli A, Ferrer M, Bonten MJ.** 2013. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of

individual patient data from randomised prevention studies. Lancet Infect Dis **13**(8):665-71. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70081-1.

31. **Miles G, Movileanu L, Bayley H.** 2002. Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. Protein Sci **11**(4):894-902.

32. **Milheiriço C, Oliveira DC, Lencastre H.** 2007. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of mec Element Types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Ag Chemother **51**(9): 3374–3377.

33. **Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S**. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microb **29**: 2240-2244.

34. **Muralimohan G1, Rossi RJ, Guernsey LA, Thrall RS, Vella AT.** 2008. Inhalation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A induces IFN-gamma and CD8 T cell-dependent airway and interstitial lung pathology in mice. J Immunol **181**(5):3698-705.

35. **Oliveira DC1, de Lencastre H.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother **46**(7):2155-61.

36. **Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI.** 2010. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Editora Savier 3ª edição. Capítulo 16 p.231-42.

37. **Park SA, Cho SS, Kwak GJ.** 2014. Factors influencing ventilator-associated pneumonia in cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev **15**(14):5787-91.

38. **Pasquale TR, Jabrocki B, Salstrom SJ, Wiemken TL, Peyrani P, Haque NZ, Scerpella EG, Ford KD, Zervos MJ, Ramirez JA, File TM Jr; IMPACT-HAP Study Group.** 2013. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of late-onset nosocomial pneumonia in intensive care patients in the USA. Int J Infect Dis 17:e398-403. doi: 10.1016/j.ijid.2012.12.013.

39. **Rasigade JP, Laurent F, Hubert P, Vandenesch F, Etienne J.** 2010. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. Emerg Infect Dis Aug **16**(8):1330. doi: 10.3201/eid1608.100317.

40. **Rello J, Torres A, Ricart M, Valles J, Gonzalez J, Artigas A, Rodriguez-Roisin R.** 1994. Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes. Amer J Resp Crit Care Med **150**(6):1545-9.

41. **Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Ragunath C,**

Kaplan JB, Mack D. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials **28**:1711-1720.

42. **Rose HR, Holzman RS, Altman DR, Smyth DS, Wasserman GA, Kafer JM, Wible M, Mendes RE, Torres VJ, Shopsin B.** 2015**.** Cytotoxic Virulence Predicts Mortality in Nosocomial Pneumonia Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. **211**(12):1862-74.

43. **Schuenck RP, Nouér SA, Winter Cde O, Cavalcante FS, Scotti TD, Ferreira AL, Giambiagi-de Marval M, dos Santos KR.** 2009. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis **64**(4):434-41. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.007.

44. **Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM.** 2013. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev **26**:422-47.

45. **Strandberg KL, Rotschafer JH, Vetter SM, Buonpane RA, Kranz DM,Schlievert PM.** 2010. Staphylococcal superantigens cause lethal pulmonary disease in rabbits. J Infect Dis **202**:1690–1697.

46. **Toro CM, Janvier J, Zhang K, Fonseca K, Gregson D, Church D, Laupland K, Rabin H, Elsayed S, Conly J.** 2014. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia without evidence of antecedent viral upper respiratory infection. Can J Infect Dis Med Microbiol **25**:e76-82.

47. **Wardenburg JB, Patel RJ, Schneewind O.** 2007. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. Infect Immun 75:1040-4.

48. **Zahar JR, Clec'h C, Tafflet M, Garrouste-Orgeas M, Jamali S, Mourvillier B, De Lassence A, Descorps-Declere A, Adrie C, Costa de Beauregard MA, Azoulay E, Schwebel C, Timsit JF; Outcomerea Study Group.** 2005. Is methicillin resistance associated with a worse prognosis in *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia? Clin Infect Dis **41**(9):1224-31.

Fatores de risco na etiologia de pneumonia associada à ventilação mecânica

Resumo

Pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) ocupa o primeiro lugar dentre as infecções hospitalares. Seu desenvolvimento ocorre em diferentes momentos e por diferentes patógenos sendo os principais agentes etiológicos *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de enterobactérias. Nesse âmbito, o presente estudo teve como objetivo determinar a incidência, etiologia, epidemiologia e fatores de risco para o desenvolvimento de PAV em pacientes adultos submetidos à ventilação mecânica. Foi realizado uma coorte prospectiva de pacientes nas primeiras 48 horas da ventilação mecânica com duas visitas semanais por até oito semanas para a coleta de aspirado traqueal e dados clínicos. As amostras coletadas foram cultivadas em meios específicos e identificadas bioquimicamente, e foram consideradas amostras prováveis de envolvimento na PAV quando isoladas em cultura pura, com valores iguais ou superiores a 10^6 em um intervalo de 48 horas prévias ou posteriores ao diagnóstico. Dados clínicos foram submetidos a regressão de Poisson, por método de *backwards* para determinação de fatores de risco para PAV, estratificando segundo o patógeno além de determinar os fatores de risco para aquisição de patógenos de interesse clínico. A densidade de incidência de PAV nesse estudo foi de 28,2 episódios por 1000 ventiladores dia, cujo patógeno mais isolado foi *S. aureus* seguido de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Trauma foi o único fator de risco independente para o desenvolvimento de PAV, e o uso de glicopeptídeos esteve associado negativamente ao mesmo desfecho. Em relação à estratificação de PAV segundo patógenos, trauma foi fator de risco para o desenvolvimento de PAV por *S. aureus* e por enterobactérias, e esses tiveram outros fatores como sexo feminino e doença do sistema nervoso central. Em relação aos fatores de risco para aquisição de *A. baumannii* a idade avançada e uso de esteróides estiveram associados enquanto para o isolamento de *S. aureus* foi sexo masculino e para MRSA foi ter sido submetido a cirurgia. Não foram encontrados fatores de risco para os demais patógenos. Assim, esse estudo identificou diferentes fatores do hospedeiro associados ao desenvolvimento de PAV por patógenos de interesse clínico e para a aquisição desses patógenos. O principal achado foi que a utilização de glicopeptídeos conferiu a proteção contra PAV em pacientes adultos submetidos à ventilação mecânica.

Número de palavras: 363

1. Introdução

Pneumonia nosocomial (PN) é considerada o tipo de infecção hospitalar mais frequente em pacientes internados [1], sendo possível observar subclassificações dependentes da presença ou ausência de ventilação mecânica. Assim quando submetido à intubação, o paciente está sob risco de desenvolver a PAV (pneumonia associada à ventilação mecânica) precoce, que se desenvolve a partir das primeiras 72 horas, ou tardia com desenvolvimento acima de 72 horas. Essas classificações são utilizadas para a escolha da terapia antimicrobiana devido principalmente a participação de micro-organismos multirresistentes no desenvolvimento da PAV tardia [2].

Os principais agentes causadores de PAV são *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* [3] e *Klebsiella pneumoniae* [4, 5, 6]. O maior desafio para médicos intensivistas no tratamento de PAV é a ampla resistência à antimicrobianos demonstrada pelos agentes bacterianos sendo muito frequente a presença de múltiplas resistências [7]. Tal fenômeno atrasa a escolha do tratamento correto, aumentando o risco de morte dentre os pacientes em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). Portanto, a escolha do tratamento empírico deve ser realizado de acordo com a ecologia e o perfil de resistência microbiana local obtidos através de estudos epidemiológicos [7].

Como a microbiologia em conjunto com as condições de base do paciente influenciam no desenvolvimento da PAV, a pneumonia caracteriza-se como multifatorial. Alguns fatores podem ser modificáveis se relacionados a condições

externas como posição no leito, utilização de antibióticos e outros dispositivos que promovem o suporte ventilatório e ou vital ao paciente. Esses fatores são normalmente utilizados em estudos randomizados que fornecem informações importantes na participação e como sua administração atua no desenvolvimento da PAV. Fatores de base do paciente como a presença de AIDS, trauma, traqueostomia, doença pulmonar preexistente, doença cardíaca e entre outras, são fatores de risco não-modificáveis que atuam como indicadores de grupos que merecem atenção redobrada em UTIs [8].

Assim o objetivo do presente estudo foi determinar a incidência, etiologia, epidemiologia e fatores de risco para o desenvolvimento de PAV em pacientes adultos submetidos à ventilação mecânica.

2. Material e métodos

2.1 Local do estudo e casuística

O estudo foi realizado em duas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) que admitem pacientes adultos. As duas Unidades do Serviço Especializado de Terapia Intensiva (SETI), de 16 e 9 leitos que admitem pacientes clínicos e cirúrgicos. Os sujeitos foram incluídos obedecendo os seguintes critérios: pacientes sob à Ventilação Mecânica (VM) iniciada nas 48 horas da admissão em UTI ou durante sua estadia, não ter diagnóstico prévio de pneumonia e pacientes cuja família aceite a participação no estudo através da aquisição do Termo de consentimento livre e esclarecido.

Trata-se de um estudo de coorte prospectiva tendo como desfecho de interesse a pneumonia associada à ventilação mecânica como um todo e a estratificação para determinar os fatores de risco para PAV causada por *S. aureus*, MRSA, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias. Outro desfecho foi a obtenção de culturas de aspirado traqueal positivas para esses patógenos de interesse clínico.

Os sujeitos da pesquisa foram acompanhados por um período máximo de oito semanas de internação em UTI com acompanhamento realizado semanalmente em dois dias (segundas e quintas-feiras) com intervalo de aproximadamente 3,5 dias. Durante as avaliações foram coletados os dados clínicos e aspirado traqueal. O diagnóstico de PAV foi realizado por médico da comissão de controle de infecção relacionada à assistência em saúde (CCIRAS). Foram utilizados os critérios preconizados pelo National Healthcare Safety Network (NHSN), do Center For Disease Control and Prevention® (CDC) dos Estados Unidos [9]. Brevemente, esses critérios levam em consideração achados radiológicos, sintomas clínicos e achados laboratoriais para a confirmação da PAV. Foi calculada a taxa de incidência para cada agente microbiano e a densidade de incidência para o desfecho PAV.

$$DI = \frac{NPAV * 1000}{\Sigma nVis * 3{,}5}$$

Onde: DI= densidade de incidência, NPAV =número de pacientes com o desfecho PAV/ no caso de micro-organismos N de pacientes com cultura positiva, 1000 = coeficiente padrão, $\Sigma nVis$= somatória do número de visitas dos pacientes, 3,5= número de dias de intervalo entre as visitas.

2.2 Coleta de dados clínicos

Na visita de inclusão do paciente foram obtidos os seguintes dados: sexo, idade, doenças de base e comorbidades, tempo de internação prévio à internação atual, procedimentos, presença de dispositivos invasivos (cateteres venosos centrais, sondas vesicais de demora, sondas nasogástricas/nasoenterais e drenos). Foram coletados alguns dados relacionados às duas semanas que precederem a VM: uso prévio e atual de antimicrobianos, intercorrências infecciosas anteriores e resultados de exames microbiológicos.

Nas avaliações de seguimento, foram coletados os dados de tempo de internação, procedimentos, dispositivos invasivos, utilização de antimicrobianos, intercorrências infecciosas e resultados de exames microbiológicos.

2.3 Coleta, Isolamento e Identificação Microbiana

A coleta do aspirado traqueal foi realizada por fisioterapeuta, médico ou enfermeira e imediatamente encaminhado para o Laboratório de Bacteriologia. O material clínico foi diluído 1:1 com N-acetil-Lcisteína (mucolítico) a 1%, homogeneizado e mantido por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, uma alíquota de 0,1ml dessa solução foi diluída em 9,9ml de solução fisiológica estéril e semeada com alça calibrada de 0,01ml em placas de Ágar MacConkey, Ágar Sangue de Carneiro e Baird Parker. Após incubação a 37º C por 24h as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas multiplicando o número de colônias pela diluição correspondente [10]. As culturas foram consideradas positivas a partir ou acima de 10^6 UFC. Os micro-organismos que se desenvolveram no meio de cultura

foram submetidos à coloração de Gram. Posteriormente, os micro-organismos gram-negativos isolados foram identificados por provas bioquímicas específicas para cada grupo de bactérias conforme preconizados por Koneman et al [11]. Para bacilos gram-negativos foi determinada a capacidade fermentadora em meios OF (oxidação-fermentação) com e sem óleo, e posteriormente utilizados os testes bioquímicos EPM (fermentação da glicose, produção de gás, hidrólise da uréia, L-triptofano desaminase-LTD e produção de H_2S) Mili (movimento, indol e descarboxilação da lisina) e Citrato de Simmons. Os testes de oxidase e produção de pigmento para diferenciação de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Espécies de *Acinetobacter* foram diferenciadas a partir do crescimento em citrato. Para amostras de cocos gram positivos, foram utilizadas as provas de catalase e coagulase. Posteriormente à confirmação da espécie as amostras foram conservadas em caldo nutriente com glicerol a -70°C.

2.4 Análise estatística

Foram realizadas análises pela regressão de Poisson univariada e a multivariada utilizando o método de backwards dos dados clínicos, demográficos e microbiológicos para estabelecer relação com o desenvolvimento de PAV. Pacientes que apresentaram outro diagnóstico de pneumonia (pneumonia comunitária ou pneumonia hospitalar sem ventilação mecânica) foram excluídos das análises. Os dados foram armazenados nos softwares Epi Info® (versão 3.5.2, Center for Disease Control and Prevention) e Excel e analisados pelo software NCSR®.

3. Resultados

3.1 Identificação microbiana, frequência dos patógenos e incidência de PAV

Foram incluídos no estudo 199 pacientes que apresentaram os critérios de inclusão. A densidade de incidência de PAV nesse estudo foi de 28,2 / 1000 ventiladores-dia. A idade média dos pacientes foi de 49 (15-94) anos e 129 (64%) dos pacientes pertenciam ao sexo masculino.

Foram isoladas 170 amostras bacterianas e 19 pacientes apresentaram *Candida* spp. e 57 pacientes apresentaram culturas negativas. Do total de 199 pacientes incluídos, 24 apresentaram duas ou mais espécies bacterianas isoladas em diferentes momentos e foi incluída na análise somente a espécie isolada no período de 48 horas (prévio ou posterior) ao diagnóstico da PAV em cultura pura. A Tabela 1 resume a frequência e a incidência dos micro-organismos sendo mais frequentes bacilos gram negativos, com as esterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. e gram positivos liderados por *S. aureus*.

Dos 31 pacientes que desenvolveram pneumonia, 61% (19/31) desenvolveram PAV nas primeiras 2 visitas, dentro das primeiras 72 horas, e 39% (12/31) a partir das 72 horas de intubação. Em relação aos micro-organismos isolados nas primeiras 72 horas, foi observado que 4 (4/6) das amostras de *S. aureus* isoladas desses pacientes foi MSSA e 3 amostras (3/5) de MRSA, outras espécies isoladas nesse período foram *S. epidermidis* (1/1), *Acinetobater* spp. (2/3), *Pseudomonas* spp. (1/1), *Proteus* spp. (1/2), *Klebsiella* spp. (2/2), *Enterobacter* spp. (1/3) e *Streptococcus* spp. (1/1). Na fase tardia (acima de 72 horas) foi observado uma maior frequência de amostras MRSA (2/5),

Enterobacter spp. (2/3), *Candida* spp. (1/1), *Proteus* spp. (1/2) menor frequência de MSSA (2/6) e *Acinetobacter* spp. (1/3).

Tabela 1. Frequência de micro-organismos isolados

Espécie	Número de isolados	Frequência	Incidência geral	PAV (33) N (%)	Incidência na PAV*
S. aureus	49	26%	28,62	11	6,42
ECN	19	10%	11,10	1	0,58
Streptococcus spp.	13	7%	7,59	1	0,58
P. aeruginosa	20	11%	11,68	1	0,58
A. baumannii	14	7%	8,17	3	1,75
A. lwoffii	5	2%	2,92	0	0
Klebsiella spp.	16	9%	9,34	2	1,16
Enterobacter spp.	12	6%	7,01	3	1,75
Serratia spp.	9	4%	5,25	0	0
E. coli	6	3%	3,50	0	0
Proteus spp.	6	3%	3,50	2	1,16
Shigella spp.	1	1%	0,58	0	0
Candida spp.	19	10%	11,10	1	0,58
Negativo	**57**	**--**	**--**	**7**	
Total	**189**	**100%**	**--**	**33**	

3.1 Fatores de risco para o desenvolvimento da PAV

Os resultados do Modelo de Regressão de Poisson na análise univariada revelaram somente trauma positivamente associado ao desenvolvimento de PAV, enquanto que a utilização de glicopeptídeos foi associada negativamente ao desfecho. Na análise multivariada, trauma e a utilização de beta-lactâmicos (anti-pseudomonas) foram fatores independentes para o desenvolvimento da PAV e glicopeptídeos continuou como um fator negativamente associado ao desfecho (Tabela 3).

Tabela 3. Fatores de risco para o desenvolvimento de PAV analisados pelo Modelo de Regressão de Poisson.

Fatores de risco	**Univariada**		**Multivariada (modelo final)**	
	RR (IC 95%)	P	RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	1,26 (0,62-2,55)	0.5		
Idade	1,01 (0,99-1,02)	0.3		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardíaca	0,87 (0,61-1,25)	0.5		
Doença pulmonar	0,93 (0,51-1,65)	0.3		
Doença renal	0,42 (1,16-1,15)	0.3		
Doença hepática	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Doença do Sistema Nervoso Central	1,71 (0,85-1,65)	0.5	1,48 (0,96-2,20)	0.08
Neoplasia sólida	0,70 (0,34-1,43)	0.3		
Aids	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Diabetes mellitus	0,83 (0,46-1,50)	0.3		
Trauma	**1,56 (1,10-2,20)**	**0.01**	**1,93 (1,25-2,97)**	**0.003**
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora	1,24 (0,46-3,35)	0.7		
Cateter Venoso Central	0,91 (0,54-1,54)	0.7		
Cirurgia	0,90 (0,63-1,27)	0.6		
Uso de esteródies	0,72 (0,06-1,12)	0.2		
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1,24 (0,86-1,75)	0.3	**1,54 (1,05-2,25)**	**0.03**
Outros beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas)	1,28 (0,91-1,81)	0.2		
Glicopeptídeos	**0,47 (0,26-0,89)**	**0.01**	**0,45 (0,24-0,82)**	**0.01**
Quinolonas	0,70 (0,34-1,42)	0.3		
Polimixinas	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Macrolideos	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Sulfas	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Anaerobicidas	1,32 (0,49-3,58)	0.6		
Categoria 5: micro-organismos				
Staphylococcus aureus	0,96 (0,64-1,43)	0.9		
MRSA	1,02 (0,57-1,89)	0.9		
Acinetobacter baumannii	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Pseudomonas aeruginosa	0,60 (0,30-1,23)	0.2		
Outros bacilos Gram-negativos (enterobactérias)	1,00 (0,71-1,42)	0.9		
Categoria 6: outras IRAS				
Infecção de sítio cirúrgico	0,83 (0,30-2,23)	0.7		
Infecção do trato urinário	1,41 (0,78-2,55)	0.3		
Infecção da corrente sanguínea	0,00 (0,00-indefinido)	1		
Infecção de pele	0,00 (0,00-indefinido)	1		

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança; MRSA = Methicillin-resistant*Staphylococcus aureus*.
IRAS = infecções relacionadas à assistência à saúde

Não foram encontrados fatores de risco para o desenvolvimento de PAV por MRSA e *P. aeruginosa*. Na análise univariada para fatores de risco para PAV por *A. baumannii* apresentar infecção de sitio cirúrgico foi um fator significativo (3.33 (1.00 – 11.06) 0.04), porém não foi encontrado fatores de risco independentes. Em relação à espécie *S. aureus* trauma foi o único fator independente para o desenvolvimento de PAV (Tabela 4).

Tabela 4. Fatores de risco para o desenvolvimento de PAV por *S. aureus*

Fatores de risco	**Univariada**		**Multivariada (modelo final)**	
	RR (IC 95%)	P	RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	1.77 (0.82 - 3.81)	0.1		
Idade	0.99 (0.97 - 1.02)	0.8		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardíaca	0.88 (0.47 - 1.63)	0.6		
Doença pulmonar				
Doença renal				
Doença hepática				
Doença do Sistema Nervoso Central	0.98 (0.53 - 1.82)	0.9		
Neoplasia sólida	0.90 (0.32 - 2.51)	0.8		
Aids				
Diabetes mellitus	0.8 (0.29 - 2.27)			
Trauma	1.95 (1.08 - 3.54)	0.2	**2.13 (1.13 - 4.01)**	**0.01**
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora	0.63 (0.22 - 1,77)	0.3	0.46 (0.15 - 1,38)	0.1
Cateter Venoso Central	0.72 (0.33 - 1.56)	0.4		
Cirurgia	0.68 (0.37 - 1.23)	0.2		
Uso de esteróides	**0.50 (0.18 - 1.41)**	**0.1**		
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos				
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1.12 (0.60 - 2.07)	0.7		
Outros beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas)	1.45 (0.78 - 2.68)	0.2		
Glicopeptídeos	0.9 (0.32 - 2.51)	0.8		
Quinolonas				
Polimixinas				
Macrolideos				
Sulfas				
Anaerobicidas				

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança.

Em relação à PAV por enterobactérias apresentar doença do sistema nervoso central e trauma foram fatores independentes associados ao desfecho, enquanto que pertencer ao sexo masculino e ter sido submetido a cirurgia foram negativamente associados ao desenvolvimento da PAV (tabela 5).

Tabela 5. Fatores de rico para o desenvolvimento de PAV por bacilos gram negativos fermentadores.

Fatores de risco	Univariada		Multivariada (modelo final)	
	RR (IC 95%)	P	RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	0.62 (0.30 - 1.27)	0.1	**0.32 (0.12 - 0.87)**	**0.02**
Idade	1.01 (0.98 - 3.30)	0.2		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardíaca	0.44 (0.15 - 1.26)	0.1	0.36 (0.11 - 1.10)	0.07
Doença pulmonar	1.15 (0.40 - 3.30)	0.7		
Doença renal				
Doença hepática				
Doença do Sistema Nervoso Central	1.33 (0.66 - 2.67)	0.4	**2.60 (1.01 - 6.69)**	**0.04**
Neoplasia sólida	1.08 (0.37 - 3.08)	0.8		
Aids				
Diabetes mellitus				
Trauma	1.30 (0.63 - 2.66)	0.4	**3.36 (1.05 - 10.71)**	**0.04**
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora				
Cateter Venoso Central				
Cirurgia	0.74 (0.37 - 1.49)	0.4	**0.39 (0.17 - 0.90)**	**0.02**
Uso de esteróides	0.95 (0.42 - 2.11)	0.9		
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos	2.24 (0.78 - 6.41)	0.1	2.85 (0.93 - 8.82)	0.06
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1.06 (0.53 -2.12)	0.8		

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança.

3.2 Fatores de risco para aquisição de micro-organismos de interesse clínico

Foram realizadas análises de fatores de risco para aquisição de *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias, *S. aureus* e MRSA. Os fatores associados à

colonização por *S. aureus* foram gênero masculino (RR= 1,35; IC95%= 1,04-1,77; p= 0,03) e a utilização de beta-lactâmicos (não-anti-pseudomonas) [RR= 0,65; IC95%= 0,51-0,83; p<0,001] com preditor de proteção.

Tabela 6. Fatores de risco para aquisição de *S. aureus* em pacientes intubados na UTI

Fatores de risco	Univariada		Multivariada (modelo final)	
	RR (IC 95%)	P	RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	**1,35 (1,04-1,77)**	**0.03**	**1,34 (1,03-1,75)**	**0.03**
Idade	0,99 (0,98-1,01)	0.4		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardiac	1,01 (,79-1,25)	0.9		
Doença pulmonary	0,78 (0,52-1,19)	0.3		
Doença renal	1,09 (0,79-1,50)	0.6		
Doença hepatica	0,95 (0,57-1,57)	0.8		
Doença do Sistema Nervoso Central	1,09 (0,84-1,40)	0.5		
Neoplasia sólida	1,26 (0,85-1,86)	0.3		
Aids	1,27 (0,47-3,40)	0.6		
Diabetes mellitus	1,02 (0,74-1,42)	0.9		
Trauma	0,77 (0,55-1,07)	0.1		
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora	0,71 (0,45-1,12)	0.1		
Cateter Venoso Central	0,77 (0,55-1,08)	0.1		
Cirurgia	0,84 (0,66-1,08)	0.2		
Uso de esteróides	1,01 (0,77-1,33)	0.9		
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos	0,00 (0,00 - ...)			
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1,05 (0,81-1,34)			
Outros beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas)	**0,64 (0,50-0,81)**	**0.004**	**0,65 (0,51-0,83)**	**<0,001**
Glicopeptídeos	**0,67 (0,50-0,90)**	**0.007**		
Quinolonas	1,03 (0,72-1,50)	0.9		
Polimixinas	0,69 (0,46-1,07)	0.09		
Macrolideos	0,88 (0,56-1,40)	0.6		
Sulfas	0,00 (0,00-...)	1		
Anaerobicidas	0,84 (0,42-1,70)	0.6		

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança.

Os preditores independentes de colonização por MRSA foram procedimentos cirúrgicos (RR= 2,22; IC95%= 1,15-4,27; p= 0,01) e relação inversa com doença do sistema nervoso central (RR= 0,53; IC95%= 0,28-0,99; p= 0,04).

Tabela 7. Fatores de risco para aquisição de MRSA em pacientes intubados na UTI

Fatores de risco	Univariada		Multivariada (modelo final)	
	RR (IC 95%)	P	RR (IC 95%)	P
Categoria 1: Dados demográficos				
Sexo masculino	1,55 (0,91-2,77)	0.1		
Idade	0,99 (0,96-1,01)	0.3		
Categoria 2: comorbidades				
Doença cardíaca	0,86 (0,53-1,40)	0.5		
Doença pulmonar	1,24 (0,71-2,16)	0.4		
Doença renal	1,53 (0,91-2,56)	0.1		
Doença hepática	1,66 (0,80-3,47)	0.2	1,99 (0,91-4,34)	0.08
Doença do Sistema Nervoso Central	**0,52 (0,28-0,97)**	**0.04**	**0,53 (0,28-0,99)**	**0.048**
Neoplasia sólida	0,94 (0,45-1,97)	0.9		
Aids	0,00 (0,00-...)	1		
Diabetes mellitus	1,31 (0,75-2,28)	0.3	1,74 (0,98-3,10)	0.06
Trauma	1,42 (0,89-2,29)	0.1		
Categoria 3: procedimentos				
Sonda Vesical de Demora	3803 (0,00-...)	1		
Cateter Venoso Central	3154 (0,00-...)	1		
Cirurgia	**1,90 (1,02-3,53)**	**0.004**	**2,22 (1,15-4,27)**	**0.01**
Uso de esteróides	1,01 (0,77-1,33)	0.9		
Categoria 4: antimicrobianos				
Carbapenêmicos	0,00 (0,00-...)	1		
Outros beta-lactâmicos (anti-pseudomonas)	1,43 (0,89-2,30)	0.1		
Outros beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas)	0,74 (0,46-1,15)	0.2	0,66 (0,41-1,02)	0.08
Glicopeptídeos	1,10 (0,69-1,75)	0.7		
Quinolonas	0,00 (0,00-...)	1		
Polimixinas	0,98 (0,53-1,82)	0.9		
Macrolideos	1,11 (0,53-2,31)	0.8		
Sulfas	0,00 (0,00-...)	1		
Anaerobicidas	1,02 (0,37-2,79)	0.9		

RR =*rate ratio*; IC=Intervalo de confiança.

Não foram encontrados fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas* spp. e enterobactérias na UTI. Enquanto que uso de esteróides (RR= 1,98 IC95%=1,19-3,29 p= 0,008) e a idade (RR=1,03 IC95%= 1,01-1,05 p= 0,03) foram fatores preditores independentes para aquisição de *A. baumannii*.

4. Discussão

A densidade incidência da PAV no presente estudo esteve dentro da média encontrada por outros estudos. A densidade de incidência de PAV apresentou valores entre 16,8 a 31,7 por 1000 ventiladores-dia em estudos anteriores [12, 13] até valores mais altos como 58,2/1000 ventiladores-dia [14].

A espécie mais frequente isolada dos pacientes em ventilação mecânica foi *S. aureus*, seguido dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Os potenciais agentes etiológicos isolados de PAV foram *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. concordando com achados anteriores [4, 5, 6]. A frequência e participação de determinados patógenos na PAV depende do tempo em que se desenvolve no paciente [5] e o tipo de terapia com antimicrobianos realizada [6].

Foi observado uma frequência maior de MRSA nas PAVs tardias e MSSA na pneumonia precoce. Verificamos a presença de MRSA, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., micro-organismos normalmente associados a PAV tardia como obtido em estudos anteriores [5] e em alguns pacientes com PAV precoce. Assim, o diagnóstico microbiológico pode auxiliar no tratamento adequado o que aumenta o sucesso terapêutico.

A presença de trauma foi o único fator de risco independente associado a PAV, e quando estratificado por patógenos foi associada à PAV por *S. aureus* e enterobactérias, discutida posteriormente. Apresentar doença do sistema nervoso central foi marginalmente significativo para o desenvolvimento de PAV. Outros estudos também encontraram que a admissão na UTI por trauma [15, 16, 17] e doença do sistema nervoso central [15] predispõem o paciente a desenvolver PAV. Estudo recente realizado por Gianakis et al [18] conclui que pacientes com trauma e dano cerebral pertencem a grupos de grande risco de PAV. Pacientes com doença do sistema nervoso central, um conjunto de diferentes tipos de doenças, estão associados a predisposição às infecções hospitalares, principalmente a pneumonia, devido a interferência dessa morbidade sobre o reflexo respiratório.

Além dos fatores de base do paciente verificamos uma associação entre a utilização de beta-lactâmicos (anti-pseudomonas, por exemplo piperacilina/tazobactam) como fator de risco para a PAV. Porém, a administração de antimicrobianos da classe glicopeptídeos mostrou-se associado negativamente ao desenvolvimento da PAV. Assim como verificado anteriormente, a utilização de antimicrobianos e sua associação no desenvolvimento da PAV pode ser caracterizado como fator de risco [19] ou fator protetor [15, 20]. Como verificamos maior isolamento de *S. aureus*, o efeito protetor conferido pela utilização do glicopeptídeo pode ter se dado a partir da epidemiologia local da PAV.

A utilização da vancomicina para o tratamento de PAV é muito explorada na literatura principalmente em relação à eficácia comparada a outros antimicrobianos

(como por exemplo a linezolida) e seus efeitos no paciente [21]. O uso da vancomicina está associada a ocorrência de falência renal, restringindo sua indicação dependendo da condição de base do paciente [22]. Além disso, estudos verificaram que a concentração da vancomicina no tecido pulmonar não ultrapassa 50% do concentração sanguínea o que interfere na eficácia do tratamento [23]. Até o momento resultados dos estudos relacionam somente o uso da vancomicina no tratamento da pneumonia e não sua importância na prevenção, assim nosso estudo sugere uma associação inédita destacando a importância do uso de glicopeptídeos na prevenção da PAV. Tal achado pode trazer benefícios para o paciente relacionado ao uso inicial precoce da vancomicina nos pacientes submetidos a ventilação e a ecologia/epidemiologia da PAV local.

Trauma foi um fator de risco independente para o desenvolvimento da PAV por *S. aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Rello et al [20] quando comparados a pacientes dos quais se isolaram MRSA, que obtiveram outros fatores de risco. Pertencer ao sexo feminino, a presença de doença do sistema nervoso central e trauma foram fatores de risco para PAV por enterobactérias, enquanto que cirurgia apresentou relação inversa com o mesmo desfecho. A presença de trauma, especialmente trauma craniano, foi um fator de risco para o desenvolvimento de PAV no qual os micro-organismos mais isolados foram as enterobactérias [24].

A ausência de fatores de risco para a colonização por *P. aeruginosa* e enterobactérias em pacientes intubados em UTI foi surpreendente. Mas foi observado que ao excluir os pacientes com outros tipos de pneumonia da análise, a maioria dos

casos de *Pseudomonas* spp. e enterobactérias diminuiu o que nos leva a especular que esses agentes podem estar mais associados à pneumonia hospitalar não associada à ventilação mecânica (dados não mostrados).

O isolamento da espécie *A. baumannii* foi associado a pacientes com idade mais avançada e foi associada ao uso de esteroides. Resultados similares foram relatados por Weerarak et al [25] e Chaiwat et al [26]. A associação de *A. baumannii* com a idade avançada e com o uso de esteroides sugere que a aquisição desse agente pode estar relacionada a variações da eficiência do sistema imunológico do hospedeiro em realizar o *clearance* bacteriano.

O fator associado à colonização por *S. aureus* como um todo foi o gênero masculino, enquanto que a cirurgia esteve associada ao isolamento de MRSA. Vários estudos também relatam que pertencer ao sexo masculino está associado ao desenvolvimento de PAV [27, 28]. A presença de diabetes mellitus e de doença hepática foram marginalmente associados ao isolamento de MRSA. De forma interessante nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao gênero para o desenvolvimento de PAV por MRSA, concordando com achados anteriores [29].

A utilização de beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas), foi um fator independente negativamente associado à PAV por *S. aureus*. A utilização de antimicrobianos é um fator controverso no desenvolvimento da PAV uma vez que estão mais associados como fatores que predispõe a infecção do que conferem proteção especialmente em relação a cepas resistentes [20]. Em conjunto com os

achados dos outros modelos, esses resultados podem contribuir com as condutas clínicas na utilização de antimicrobianos em pacientes adultos submetidos à ventilação mecânica.

Os pontos fortes do presente estudo residem principalmente no desenho de coorte-prospectiva que permite verificar as mudanças de condições de base do paciente e de intervenção terapêutica que possivelmente interferem no desfecho do paciente. Além disso é possível correlacionar esses fatores de forma mais refinada com o desenvolvimento da pneumonia. No entanto nosso estudo apresenta uma limitação em relação ao diagnóstico da pneumonia onde a utilização da cultura quantitativa do aspirado traqueal, embora apresente boa sensibilidade e especificidade não é o padrão-ouro e muitas vezes necessita de confirmação com técnicas mais invasivas, tais como a cultura quantitativa do lavado broncoalveolar. Assim o critério microbiológico que utilizamos sugere o micro-organismo mais provável de estar causando PAV.

Esse estudo identificou diferentes fatores do hospedeiro associados ao desenvolvimento de PAV por patógenos de interesse clínico e também fatores associados ao carreamento desses patógenos. O principal achado, porém, foi a proteção contra PAV com a utilização de glicopeptídeos e ousamos acreditar que esse resultado tem aplicação prática para o direcionamento de antibioticoterapia em pacientes adultos submetidos à ventilação mecânica.

5. Referências[1]

1. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, et al (2014) Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med 370(13):1198-208.

2. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 15;171(4):388-416.

3. Klompas M, Kleinman K, Murphy MV (2014) Descriptive epidemiology and attributable morbidity of ventilator-associated events. Infect Control Hosp Epidemiol 35(5):502-10. doi: 10.1086/675834.

4. Bassetti M, Taramasso L, Giacobbe DR, Pelosi P (2012) Management of ventilator-associated pneumonia: epidemiology, diagnosis and antimicrobial therapy. Expert Rev Anti Infect Ther 10(5):585-96. doi: 10.1586/eri.12.36.

5. Akça O, Koltka K, Uzel S, et al (2000) Risk factors for early-onset, ventilator-associated pneumonia in critical care patients: selected multiresistant versus nonresistant bacteria. Anesthesiology 93(3):638-45.

6. Rello J, Sa-Borges M, Correa H, Leal SR, Baraibar J (1999) Variations in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites: implications for antimicrobial prescribing practices. Am J Respir Crit Care Med 160(2):608-13.

7. Garnacho-Montero J, Corcia-Palomo Y, Amaya-Villar R, Martin-Villen L (2014) How to treat VAP due to MDR pathogens in ICU patients. BMC Infect Dis 28;14:135. doi: 10.1186/1471-2334-14-135.

8. Bonten MJM, Kollef MH, Hall JB (2004) Risk Factors for Ventilator-Associated Pneumonia: From Epidemiology to Patient Management. Clinical Infectious Diseases 38:1141–9.

9. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA (2008) CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control 36:309-32.

10. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI (2010) Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3rd edn Savier. Brazil, pp 231-242.

11. Konemman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM (2001) Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5th edn Medsi Rio de Janeiro, Brazil.

[1] Referências formatadas de acordo com o periódico Journal of Intensive Care Medicine.

12. Memish ZA, Cunningham G, Oni GA, Djazmati W (2000) The incidence and risk factors of ventilator-associated pneumonia in a Riyadh hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 21(4):271-3.

13. Ranjan N, Chaudhary U2, Chaudhry D3, Ranjan KP (2014) Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care intensive care unit: Analysis of incidence, risk factors and mortality. Indian J Crit Care Med 18(4):200-4. doi: 10.4103/0972-5229.130570.

14. Carrilho CMDM, Grion CMC, Carvalho LM, Grion A, Matsuo T (2006) Pneumonia associada à ventilação mecânica em Unidade de Terapia Intensiva cirúrgica. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 18(1):38-44.

15. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, et al (1998) Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. Ann Intern Med 15;129(6):433-40.

16. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, et al (2002) VAP Outcomes Scientific Advisory Group. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. Chest 122(6):2115-21.

17. Cook A, Norwood S, Berne J (2010) Ventilator-associated pneumonia is more common and of less consequence in trauma patients compared with other critically ill patients. J Trauma 69(5):1083-91. doi: 10.1097/TA.0b013e3181f9fb51.

18. Gianakis A, McNett M, Belle J, et al (2015) Risk factors for ventilator-associated pneumonia: among trauma patients with and without brain injury. J Trauma Nurs. 2015 May-Jun;22(3):125-31. doi: 10.1097/JTN.0000000000000121.

19. Beck-Sague CM, Sinkowitz RL, Chinn RY, et al (1996) Risk factors for ventilator-associated pneumonia in surgical intensive-care-unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol 17(6):374-6.

20. Rello J, Torres A, Ricart M, et al (1994) Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes. Am J Respir Crit Care Med 150:1545-9. doi: 10.1164/ajrccm.150.6.7952612

21. Chan JD, Pham TN, Wong J, et al (2011) Clinical outcomes of linezolid vs vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia: retrospective analysis. J Intensive Care Med 26(6):385-91. doi: 10.1177/0885066610392893.

22. Peyrani P, Ramirez J (2015) What is the best therapeutic approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia? Curr Opin Infect Dis 28(2):164-70. doi: 10.1097/QCO.0000000000000149.

23. Lodise TP, George LD, Jill M (2011) Butterfield, Joshua Scoville, Mark Gotfried, and Keith A. Rodvold. Penetration of Vancomycin into Epithelial Lining Fluid in Healthy Volunteers. Antim Ag Chem 55(12):5507–5511.

24. Rodriguez JL, Gibbons KJ, Bitzer LG, et al (1991) Pneumonia: incidence, risk factors, and outcome in injured patients. J Trauma Jul;31(7):907-12.

25. Werarak P1, Waiwarawut J, Tharavichitkul P, et al (2012) *Acinetobacter baumannii* nosocomial pneumonia in tertiary care hospitals in Thailand. J Med Assoc Thai 2:S23-33.

26. Nakaviroj S, Cherdrungsi R, Chaiwat O (2014) Incidence and risk factors for ventilator-associated pneumonia in the surgical intensive care unit, Siriraj Hospital. J Med Assoc Thai 1:S61-8.

27. Elatrous S, Boujdaria R, Merghili S, et al (1996) Incidence and risk factors of ventilator-associated pneumonia: a one-year prospective survey. Clin Int Care 7(6): 276-281.

28. Cinotti R, Dordonnat-Moynard A, Feuillet F, et al (2014) Risk factors and pathogens involved in early ventilator-acquired pneumonia in patients with severe subarachnoid hemorrhage. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33(5):823-30. doi: 10.1007/s10096-013-2020-8.

29. Bouza E, Giannella M, Bunsow E, et al (2012) Task Force for Pneumonia (GANG). Ventilator-associated pneumonia due to meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk factors and outcome in a large general hospital. J Hosp Infect 80(2):150-5. doi: 10.1016/j.jhin.2011.11.013.

Fatal pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* ST398

Abstract

Rationale: The livestock-associated ST398 lineage of *Staphylococcus aureus* represents a large reservoir for human infection. However, it has as of yet only rarely been reported to cause severe disease in humans.

Objectives: We compared epidemiology and virulence potential of *S. aureus* strains that were isolated from patients during mechanical ventilation, focusing on ST398 strains, which during our investigation emerged as a considerable new source of fatal pneumonia.

Methods: All isolates were characterized for sequence type, antimicrobial resistance, virulence factor presence, and production of main pneumonia virulence determinants. Virulence of ST398 was compared in a murine pneumonia model with reference strains and ST398 cytolysin gene deletion mutants.

Measurements and Main Results: ST398 caused severe and fatal pneumonia and revealed exceptional production of cytolytic toxins and capacity to lyse human red and white blood cells. Analysis of isogenic gene deletion mutants in a murine model of pneumonia identified α-toxin as a major cause of mortality due to ST398.

Conclusions: ST398 emerges as a significant cause of severe lung infection, which is linked to an exceptionally high aggressive virulence potential, and in particular, α-toxin. With further acquisition from animal sources and distribution between hospitals being likely, we caution that an aggressive subset of ST398 strains such as those identified in our study may become a widely distributed cause of severe *S. aureus* pneumonia. Furthermore, our study indicates that increased consideration

should be given to extreme virulence as a determinant of the clinical outcome of *S. aureus* lung infections.

Word count (abstract): 245

1. Introduction

Pneumonia is a widespread and severe disease that can be acquired outside the hospital (community-acquired pneumonia, CAP) or in the hospital (nosocomial pneumonia, NP). It represents, together with surgical site infections, the leading cause of health care-associated infections (1). Among NP cases, most are due to mechanical ventilation (ventilator-associated pneumonia, VAP), while other NP cases are referred to as HAP (hospital-associated pneumonia). *Staphylococcus aureus* is the most important pathogen in all types of pneumonia (1, 2). Mortality rates range from ~10% (CAP) to ~30% (VAP) (2). The percentage of methicillin-resistant (MRSA) pneumonia isolates varies considerably by geographical region. In the U.S. in 2005, about 50% of HAP and ~ 35% of VAP and CAP were caused by MRSA (2), with recent years experiencing a general surge in community-acquired MRSA infections due to pulsed-field type USA300 (3). Most research into the underlying basis of virulence during *S. aureus* lung infections has been performed using the USA300 clone (4, 5). Virulence determinants impacting the progression of severe pneumonia include the cytolysins α-toxin, phenol-soluble modulins (PSMs)α, among which PSMα3 is the most cytolytic, and the Panton-Valentine leukocidin (PVL) as well as the immune evasion protein, protein A (4, 6-10).

S. aureus ST398 is a clone that is traditionally associated with livestock (11, 12). Methicillin-resistant ST398 strains have often been described as a severe threat for public health, but livestock-associated (LA)-MRSA infections in humans are rare (13, 14). In contrast, there have been recent reports of animal-independent spread of ST398 MSSA strains in humans (15, 16). These ST398 strains have primarily been associated with skin and soft tissue and bloodstream infections (15). High virulence and lethal infection outcome, in particular due to pneumonia, have not yet been linked to ST398. In one case of necrotizing pneumonia by an ST398 MRSA strain, lethal outcome was linked to PVL (17), but the presence of PVL genes is exceptional in ST398 strains (11, 15). Notably, virulence of ST398 strains has so far only been addressed by analysis of gene presence or whole-genome sequencing (11, 18, 19). There is one recent study that investigated an ST398 transposon bank for survival in porcine blood (20), but there are virtually no data on the role of virulence factors in isolates of the ST398 lineage achieved by advanced molecular investigation such as by the use of isogenic virulence gene deletion mutants, gene expression data, or animal infection models.

In the present study, we describe several severe and fatal pneumonia cases caused by ST398 MSSA that occurred during the timeframe of a prospective study of *S. aureus* strains isolated from patients under mechanical ventilation at the ICU of a Brazilian hospital. We found that virulence of these strains was exceptionally high in terms of cytolysin expression, in-vitro cytolytic potency, and virulence in an animal model of lung infection. Construction and analysis of isogenic cytolysin gene

deletion mutants identified α-toxin as a major cause for the high virulence potential of these ST398 strains.

2. Methods

2.1 Study design

Inclusion criteria for participants were mechanical ventilation initiation in the first 48 h of ICU admission or during the ICU stay. Patients with diagnosis of pneumonia before intubation were excluded. The research protocol was approved by the Botucatu Medical School Institutional Review Board (approval number 290/11).

Pneumonia was defined according to CDC definitions based on radiological findings (new or progressive and persistent infiltrate, consolidation, or cavitation), clinical symptoms (fever > 38^{o}C, leukocytosis, or leukopenia) and laboratory analyses (positive blood culture not related to other infections, positive pleural culture, or positive quantitative minimal-contaminated lower respiratory tract sample) (21). For patients over 70 years, criteria included altered mental status with no other recognized cause and at least two of the following: changes in the respiratory secretions, new onset occurring in the respiratory status, rales or bronchial sounds, worsening in gas exchange.

Diagnoses of pneumonia types were obtained during mechanical ventilation according to the time of development. CAP was defined as occurring in patients that had no previous hospital contact and/or developing during the first 48 h of hospitalization, HAP as occurring in non-intubated in-patients after 48 h of hospitalization and VAP after 48 h following the intubation.

2.2 Culture processing

Quantitative cultures from pharyngeal samples were obtained as follows. Samples were diluted 1:2 with 1% N-acetyl-L-cysteine to dissolve the mucus, vortexed, and kept for 10 min at room temperature. The fluid smear was diluted 1:10 in saline solution and vortexed. Then, 10 µl of this solution were plated onto 5% sheep blood, Mac Conkey, and Baird Parker agar, and incubated for 24 h at 37^{o} C. 10^{5} CFU was used as a lower-level cutoff for a single pathogen to identify a culture as positive. *S. aureus* was identified according to catalase and coagulase production.

2.3 Virulence and *mecA* gene detection; SCC*mec* typing

Presence of virulence and *mecA* genes was assayed by analytical PCR using genomic DNA. Oligonucleotides are shown in Table 1. For all *mecA*-positive strains, SCC*mec* typing was performed as described (53).

2.4 Antimicrobial susceptibility tests

We analyzed resistance to antibiotics using the disk diffusion method for the following antibiotics with the given amount: gentamycin, 10 µg, penicillin G, 10 µg, cefoxitin, 30 µg, erythromycin, 15 µg, and clindamycin, 2 µg, according to the guidelines proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, standard M100-S24). The D-test for inducible resistance was performed by placing a disk with erythromycin (15 µg) 15-26 mm apart from a disk with clindamycin (2 µg) on a Mueller-Hinton agar plate, according to CLSI guidelines.

We also determined resistance to oxacillin, vancomycin, linezolid, daptomycin, quinopristin/dalfopristin and tigecycline by E-tests. Susceptibility/resistance was determined according to the CLSI (2014) breakpoints. Strains showing intermediate resistance were considered resistant.

2.5 ST 398 PFGE

The pulsed field gel electrophoresis was performed according to Rasschaaert et al (2009) using ApaI restriction enzyme. The restriction fragments were placed on a gel and performed an electrophoresis in the system CHEF-DRIII (Bio Rad Laboratories, EUA). The software BioNumerics analyzed the clonal relatedness using the Dice coefficient, UPGMA method with tolerance 1 and optimization 1.2, with similarity of 80% to define the clusters according to Tenover (2005).

2.6 MLST

Multi-locus sequence typing (MLST) analysis was performed using primers and PCR conditions as described (Enright et al 2000). DNA sequencing was performed by Macrogen and analysis of the sequenced products was done using Seqbuider® and the MLST official website (www.mlst.net).

2.7 Spa typing

Staphylococcal protein A (Spa) typing was performed as described by Kahl et al (22). The Ridom spa server website (http://www.ridom.de/spaserver/) was used to analyze *spa* sequences.

2.8 Production of isogenic gene deletion mutants

Isogenic *psm*α and *hla* gene deletion mutants were produced by allelic replacement using plasmid pKOR1 as described (23). For deletion of *psm*α, an existing construct was used (24) and for *hla*, a new construct was made. Oligonucleotides to amplify the ~ 1-kb flanking regions around the *hla* gene are listed in Table 1.

2.9 PSM analysis

S. aureus strains were grown for 16 h in tryptic soy broth (TSB), cells were spun down, and supernatants were analyzed for PSMs by reversed-phase high performance liquid chromatography/ mass spectrometry (RP-HPLC/MS) as described (25).

2.10 Western blot

For Western Blot analysis, strains were grown for 8 h in TSB, and aliquots were applied to electrophoresis. Protein gels were then blotted onto nitrocellulose membranes, which were blocked in SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Scientific), followed by incubation with anti-staphylococcal α-toxin rabbit serum (Sigma-Aldrich) in blocking buffer (1:1000). After washing with TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20), Cy5-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies) was applied to the membrane in blocking buffer (1:4000). Membranes were washed with TBST, scanned using a Typhoon Trio Plus (GE Healthcare Life Sciences) and signals were quantified with ImageQuant TL software (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

2.11 Neutrophil lysis and hemolysis assays

Human blood was obtained from anonymized donors under approved protocols at the NIH Blood Bank. Culture filtrates were collected from bacterial cultures grown for 8 h. Hemolytic activities were determined by incubating samples with human erythrocytes (2% (v/v) in Dulbecco's PBS) for 1 h at 37 °C and measuring the optical density at 540 nm. Human neutrophils were isolated from heparinized venous blood with a standard method. Lysis was measured using a lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity detection kit according to the manufacturer's protocol (Roche) as described (26).

2.13 Mouse pneumonia model

Anesthetized, 6 – 8 week old CD-1 female mice (Charles River Laboratories) were challenged intranasally with 30 µl of *S. aureus* containing ~1x10^8 CFUs obtained from *S. aureus* cultures grown to exponential grown phase. Mouse survival was monitored every 3 h for 24 h and every 8 h thereafter. Animal experiments were performed in accordance with ACUC guidelines and the Animal Study Protocol, number LHBP1E, of the NIAID Intramural Research Program.

2.14 Statistical analyses

Statistics were performed using Graph Pad Prism 6 using t-tests for the comparisons of two and 1-way ANOVA for those of more groups. Error bars show standard deviation (SD).

3. Results

3.1 ST398 emerges as a cause of severe and fatal pneumonia.

To investigate the epidemiology of hospital-associated *S. aureus* pneumonia, we performed a prospective study at the hospital of Botucatu Medical School, Botucatu, Brazil over the course of 16 months (from November 2011 to August of 2013), which included all adult (> 18 years old) patients at the ICU under mechanical ventilation (n=270). Twice a week over 8 weeks, tracheal aspirate samples were collected and clinical data recorded.

S. aureus was isolated from 47 patients (Tab. 2, Supplemental Tab. 1). 27 of those patients developed pneumonia and two patients developed other respiratory infections (one tracheitis, one sinusitis). Only in four cases, two different strains were isolated from one patient. The strain that was isolated later was assumed to be responsible for the infection that had developed. All *S. aureus* isolates were subjected to antimicrobial resistance profiling (Tab. 2, Supplemental Tab. 1). Methicillin resistance occurred in 22 isolates (47%). SCC*mec* typing showed that the majority of MRSA isolates belonged to SCC*mec* type II (17/22; 77%). Methicillin resistance was more common in HAP (7 of 9, 78%) than in CAP (1 of 7, 14%) or only colonizing (without progression to respiratory infection, 6 of 18, 33%) isolates. VAP isolates in our study were resistant to methicillin in almost half (45%) of cases.

We typed all isolates by MLST, which showed that most isolates belonged to STs 5 and 105, which are reportedly the most widely distributed hospital-associated infectious *S. aureus* isolates in Brazil (27, 28). Surprisingly, we found a considerable number of isolates (5; 11%) that belonged to the livestock-associated ST398 lineage.

More intriguingly even, the rate of pneumonia cases was highest among the ST398 lineage (80%) as was the fatality rate due to pneumonia (3 out of 4 pneumonia cases, 75%) (Fig. 1).

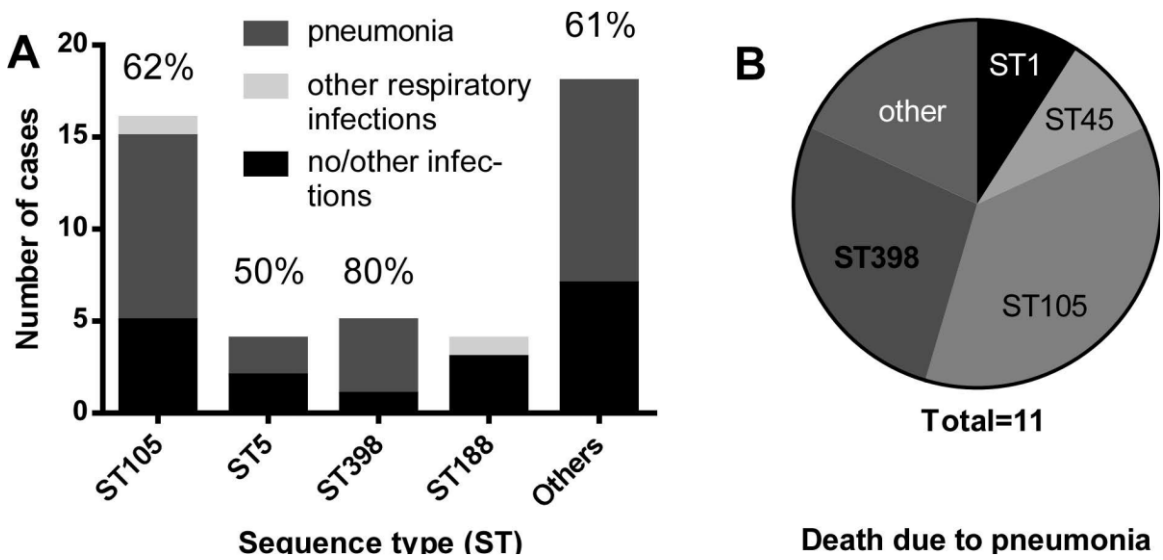

Figure 1. ST and link to disease type of obtained *Staphylococcus aureus* isolates. Link to disease type by ST. Numbers on top of bars show the percentage of pneumonia cases per ST. (B) Fatal pneumonia cases by ST. All STs with > 2 isolates are shown separately in (A) and (B).

Three of 11 (27%) fatal pneumonia cases in the reported time frame were due to ST398 isolates. All ST398 isolates were methicillin-sensitive and belonged to *spa* type t1451. Brief case reports of all ST398-associated cases are shown in Table 3. Notably, there was at least one case of fatal ST398 pneumonia, for which the patient did not report animal contact, indicative of potential nosocomial acquisition of the infecting strain as obtained by PFGE clonal profile analysis. The strains were 82.1% similar suggesting they belong to the same clone from a putative unique source (Fig. 2).

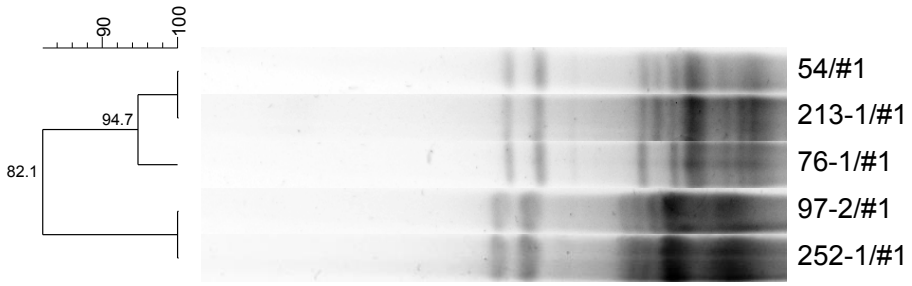

Figure 2. Restriction fragments analysis of ST 398 strains. Comparison of ST398 strains isolated from patients with and without pneumonia.

3.2 The ST398 isolates show high expression of cytolytic toxins.

To investigate whether pneumonia was due to a specific virulence gene in our cohort of patients, and to understand the molecular basis of the exceptionally strong capacity of the ST398 isolates to cause severe pneumonia, we first analyzed all isolates for the presence of a series of key virulence genes (Tab. 1; Supplemental Tab. 1). However, there was no significant correlation of any of the investigated genes with pneumonia or fatality.

Recently, we reported that the severity of staphylococcal skin infection is influenced to a considerable degree by the expression level of widely distributed virulence determinants rather than by the mere absence or presence of mobile genetic element-encoded virulence genes that are limited to certain strains (29, 30). Therefore, we hypothesized that the exceptional capacity of the ST398 isolates to cause pneumonia may be related to the expression, rather than mere gene presence, of specific *S. aureus* molecules previously reported to contribute to the progression of severe and fatal pneumonia. As the *lukSF* genes encoding PVL were not present in

the ST398 isolates, we focused on α-toxin, PSM peptides, and protein A. In the ST398 isolates, in-vitro expression levels of the most cytolytic PSM, PSMα3 and α-toxin were among the highest detected, and significantly higher when compared to the other (non-ST398) isolates (Fig. 3A). The same strong differences between ST398 isolates and those of other STs were found when only comparing pneumonia isolates (Fig. 3B). Differences in other PSMs were similar, as they are all under common regulation by Agr (30, 31) (Supplemental Tab. 1). Furthermore, PSM and α-toxin levels were at the levels or even exceeding the levels detected in the highly virulent community-associated MRSA clone USA300, which is known to express PSMs and α-toxin at high levels and whose virulence potential has been shown to rely on those cytolysins (4, 29, 30, 32, 33) (Fig. 2C,D). Notably, ST398 PSM and α-toxin levels strongly exceeded those detected in the ST398 standard, genome-sequenced MRSA strain S0385 (19), which was isolated from a case of human endocarditis in the Netherlands. In contrast, production of protein A was significantly lower in the ST398 compared to other isolates (Fig. 3A,B). Furthermore, among isolates that caused fatal pneumonia, high production of PSMα and α-toxin only occurred in ST398 strains (Fig. 3B).

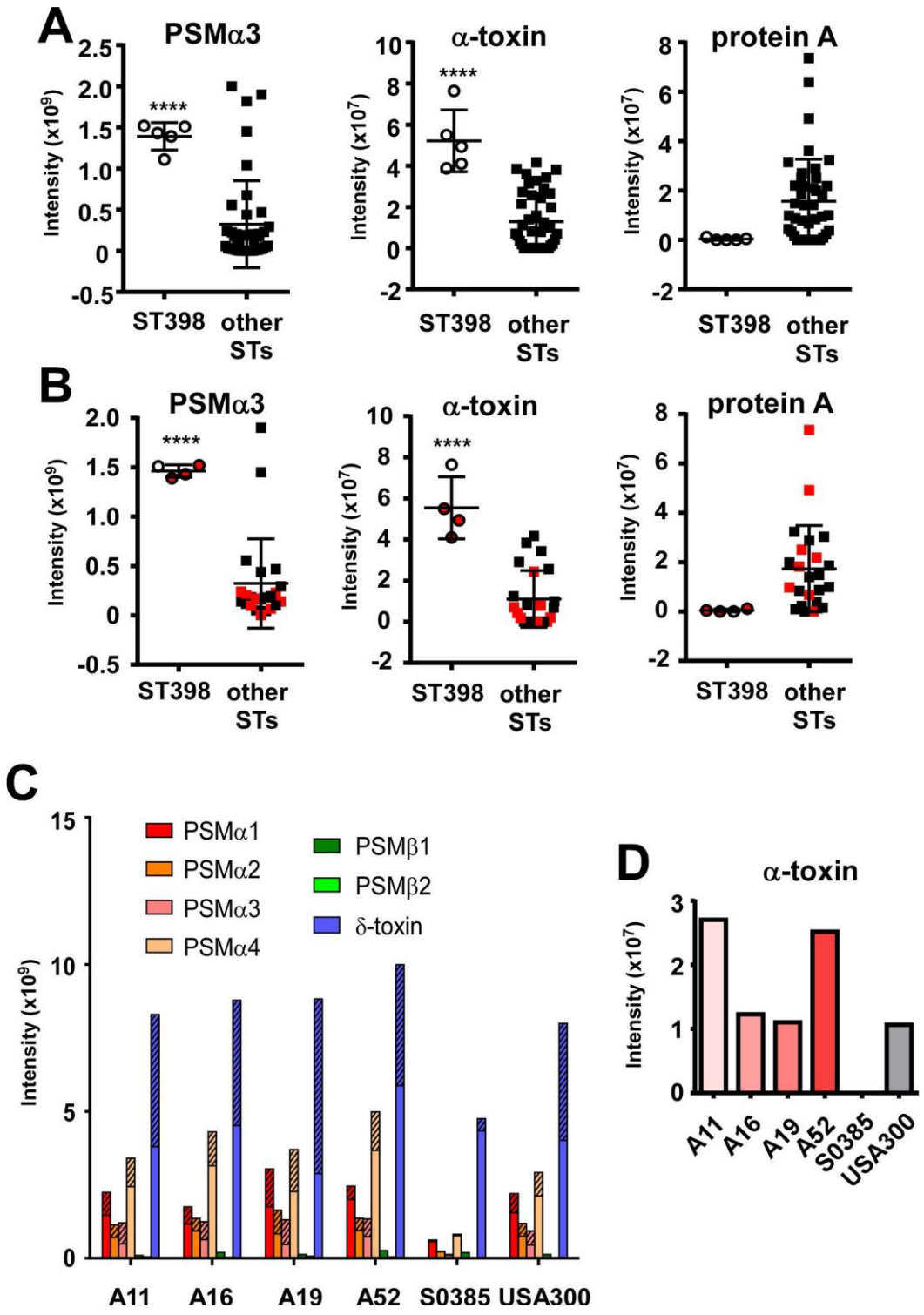

Figure 3. Production of cytolysins and protein A in ST398 versus other STs. (A) Comparison of all obtained isolates. (B) Comparison of only pneumonia cases. Red symbols represent fatal cases. (C,D) Comparison of PSM peptide (C) and α-toxin (D) production between ST398 pneumonia and standard strains. (A,B) ****, $p<0.0001$.

The link between disease severity and cytolysin production in ST398 strains as opposed to other STs may be due to differences in methicillin resistance, a notion that is supported by previous findings showing a correlation between virulence and hemolysis, but only in MSSA strains (34). The percentage of non-ST398 pneumonia cases in our study that were due to MRSA was high (61%; 62.5% for fatal cases), suggesting that limited treatment options due to methicillin resistance explain morbidity and mortality for those cases, whereas our results support the notion that MSSA virulence is due to cytolysin production. However, when we compared cytolysin production between MSSA and MRSA strains, we found no difference for PSMα3, and only a slight difference for α-toxin (Fig. 4A), indicating that the link between infection outcome and cytolysin production is not entirely due to the methicillin sensitivity/resistance status, but to a strong degree dependent on the strain background. Furthermore, no significant differences were found for PSMα3 or α-toxin when separately comparing CAP, HAP, and VAP cases between MRSA and MSSA (Fig. 4B). Finally, there was no difference comparing infectious to only colonizing strains (Fig. 4B). Altogether, these findings indicated that there is a specific role for PSMα peptides and α-toxin in the extraordinary virulence of ST398 isolates.

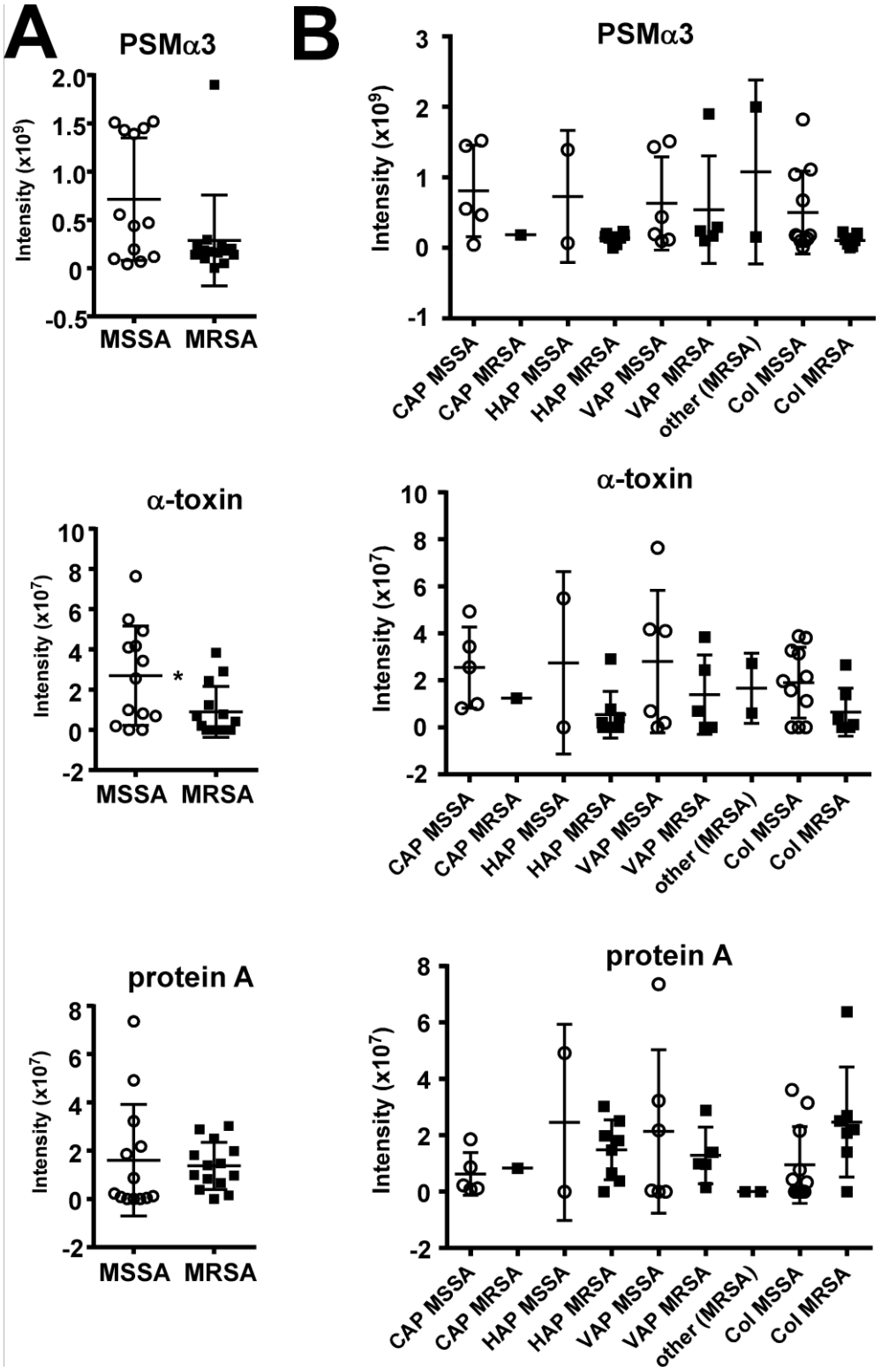

Figure 4. Production of cytolysins and protein A according to methicillin resistance status and disease type. (A) Comparison by methicillin resistance status. *, $p<0.05$. (B) Comparison by disease type. Col, colonizing strains (patients did not develop lung infection).

3.3 The ST398 isolates show high cytolytic capacity and virulence in a murine pneumonia model.

PSMα peptides and α-toxin are strong cytolysins with high capacities to kill human red and white blood cells (35, 36). All ST398 isolates from our study showed pronounced capacities to lyse human erythrocytes and neutrophils, at a level similar to that of strain SF8300, and clearly exceeding that of strain S0385, in accordance with the observed *psm*α and *hla* gene expression levels (Fig. 5). These experiments showed that high cytolysin expression levels translate to strong cytolytic capacities of the ST398 isolates, confirming high virulence potential.

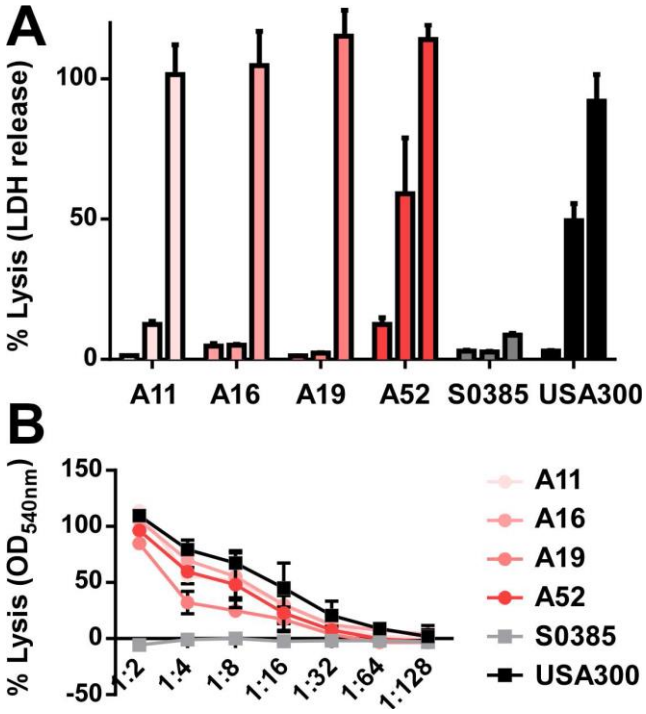

Figure 5. Cytolytic capacities of ST398 pneumonia isolates. (A) Neutrophil lysis. Culture filtrates of ST398 and standard strains were measured for their capacity to lyse human neutrophils by release of lactate dehydrogenase (LDH). The three bars for each strain represent decreasing dilutions: 1:10; 1:5; 1:2. (B) Hemolytic capacities were determined with human erythrocytes and the given increasing dilutions.

To investigate whether the high virulence potential of the ST398 isolates, as indicated by the seriousness of the human infections and the high in-vitro expression of cytolysins, can be reproduced in an infection model, we analyzed all ST398 isolates that had caused human pneumonia in a mouse pneumonia model. We again compared with strains SF8300 and S0385 (Fig. 6A). Strain S0385 did not cause deaths under the conditions of our experiment, while all other strains did. Notably, the three ST398 strains that were isolated from fatal pneumonia cases caused the highest number of deaths in mice; log-rank test results attributed significance to the difference versus the S0385 control strain to two of those three. Thus, these results indicate that the murine pneumonia model well reflected the clinical results and high virulence of the ST398 isolates.

We then used the strain that was most virulent in the infection model, isolate A19, to produce isogenic gene deletion mutants in the *psm*α operon and *hla* gene, in order to analyze the impact of these cytolysins on virulence in the background of the highly virulent ST398 pneumonia isolates. In the murine pneumonia model, both *psm*α and *hla* gene deletion mutants caused a lower number of deaths than the wild-type A19 isolate (Fig. 6B). However, only the *hla* mutant survival rates were significantly different from those of the wild-type strain, with no animals infected by the A19 *hla* mutant succumbing to the infection. These results attribute a central function to α-toxin and high α-toxin expression in the pathogenesis of fatal pneumonia by ST398 *S. aureus*.

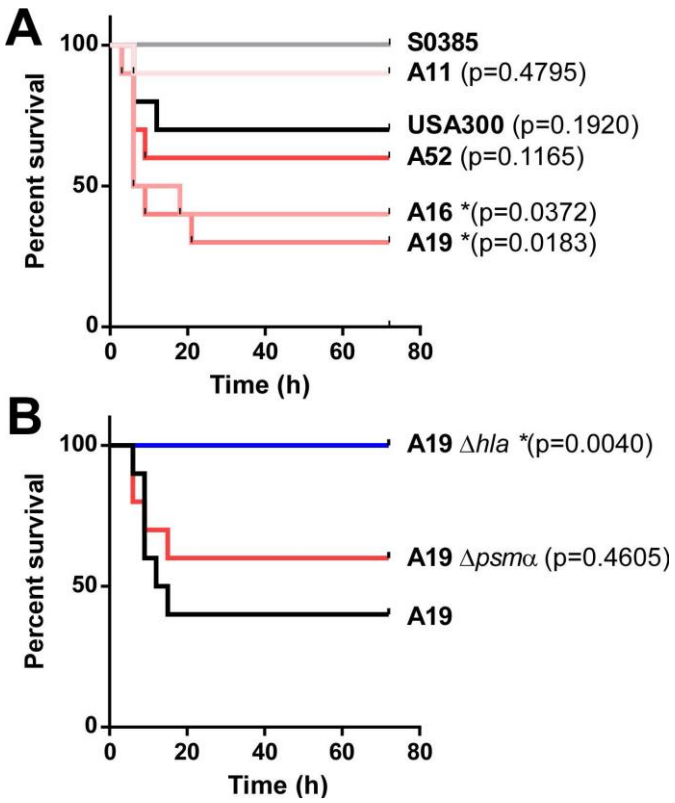

Figure 6. Mouse pneumonia model. Mice (n=10 per group) were infected intranasally with $1x10^8$ CFU and disease development was monitored for a total of 72 h. (A) Comparison of ST398 pneumonia isolates with standard strains. (B) Comparison of ST398 A19 isolate wild-type versus isogenic *hla* and *psm*α deletion strains. (A,B) Statistical results (p values) from log rank (Mantel-Cox) tests are given for each curve in comparison to the S0385 results (no death, A) or the wild-type results (B). Significant ($p<0.05$) differences are marked with an asterisk.

4. Discussion

Recently, there has been renewed interest in antibiotic resistance, mainly because several bacteria have developed resistance toward virtually any available antibiotic. In the case of MRSA, morbidity and mortality is extremely high, with ~ 11,000 deaths due to MRSA occurring annually in the U. S. alone (37). On the background of that scenario, it is often overlooked that MSSA strains also cause a considerable number

of infections, many of which are lung infections, occur in the hospitals, and can be fatal (38, 39).

While antibiotic resistance and subsequent treatment failures likely play a significant role for the morbidity and mortality that is associated with MRSA lung infections (40), our present results indicate that MSSA pneumonia is linked to a high virulence potential. This idea is supported by a significant, yet relatively weak correlation between methicillin sensitivity (as opposed to resistance) and the increased production of α-toxin that we observed. However, we noted a very strong correlation between toxin expression and ST398 genetic background (as compared to other STs), indicating that this lineage has extreme virulence potential, a notion that was further corroborated by our cytolysis and animal infection data.

With specific regard to the role of α-toxin, our findings are in general accordance with those of a recent study that found a correlation between hemolytic potential and virulence of MSSA strains during experimental lung infection (34). However, in that study, there was no direct assessment of α-toxin production by methods that specifically detect that toxin [as other toxins such as PSMs are also hemolytic (41)] or direct assessment of the role of α-toxin in MSSA lung infection by use of an isogenic MSSA *hla* mutant. Our present findings demonstrating a correlation between α-toxin production and cytolytic potential as well as our findings of strongly reduced virulence of an isogenic *hla* mutant give previously unavailable, firm molecular support to the notion that α-toxin has a preeminent role in MSSA lung infection. However, they also emphasize the role of the genetic background, inasmuch as we found high cytolysin production only for ST398 but not other STs (MSSA or MRSA).

The pivotal role of α-toxin in MSSA lung infection may thus be restricted to certain lineages, while other MSSA strains may rely on other yet undefined virulence factors.

Our findings of particularly high virulence, high toxin expression, and fatal outcome due to lung infections by ST398 strains raise two main concerns: First, widespread occurrence of ST398 strains in livestock represents a dangerous source for continued spread of such strains to humans and into hospitals, where – according to our results and previous reports (15, 42) – they may spread further, independently of animal contact, and cause an increasing number of severe infections. Second, it is conceivable that in a scenario similar to that, which produced the highly virulent CA-MRSA clone USA300 (5, 43), genetic rearrangements leading to a convergence of extreme virulence and methicillin resistance may also happen soon in ST398. Such a development appears particularly likely given the high selective pressure put on livestock-associated ST398 by the extreme use of antibiotics in animal farming, forming a large and dangerous reservoir for such strains to develop.

The contribution of virulence factors to the virulence potential of *S. aureus* can vary intensely between different strains and infection types. For example, PSMα peptides are key determinants in USA300 but not ST72 skin infections (30, 44). It is therefore vital to analyze that contribution for every given infection type and epidemiologically important strain by appropriate molecular methods such as most notably the use of isogenic gene deletion strains. Our study identifies α-toxin as a major source of infection severity and death during ST398 lung infection. In addition, to the best of our knowledge, there has been no previous study using an isogenic *hla* deletion mutant addressing virulence during lung infection in an epidemiologically

important MSSA strain. Our study thus also presents previously unavailable information about the role of α-toxin in MSSA lung infection. Our findings are in accordance with the notion of a crucial role of α-toxin in lung infection, which is based on molecular investigation of *hla* mutants in MRSA and laboratory strains (4, 7) and correlative analyses of cytolytic and pathogenic potential (34).

In summary, our study identifies ST398 MSSA as a dangerous and highly virulent emerging source of fatal pneumonia. Furthermore, our findings lend support to the notion of an extraordinarily important role of α-toxin in the pathogenesis of MSSA lung infection. Finally, they call for surveillance measures not only analyzing antibiotic resistance, but also virulence potential of *S. aureus* as an important factor that contributes to infection outcome.

Acknowledgement

The authors like to thank A. C. Fluit, Utrecht Medical Center, for providing strain S0385.

5. References[1]

1. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK, Emerging Infections Program Healthcare-Associated I, Antimicrobial Use Prevalence Survey T. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 2014; 370: 1198-1208.
2. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 2005; 128: 3854-3862.
3. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010; 375: 1557-1568.
4. Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, DeLeo FR, Schneewind O. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 2007; 13: 1405-1406.
5. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 143-162.
6. Diep B. Relative effects of Panton Valentine Leukocidin, alpha-hemolysin and alpha-type phenol-soluble modulins in pathogenesis of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Boston; 2010.
7. Bubeck Wardenburg J, Schneewind O. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Exp Med* 2008; 205: 287-294.

[1] Referências formatadas de acordo com o periódico American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

8. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 5587-5592.

9. Gomez MI, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem* 2006; 281: 20190-20196.

10. Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 281-297.

11. Fluit AC. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 735-744.

12. Smith TC, Pearson N. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 327-339.

13. Verkade E, Bosch T, Hendriks Y, Kluytmans J. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch nursing home. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33: 624-626.

14. van Cleef BA, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M, Zemlickova H, Skov RL, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Friedrich AW, Spiliopoulou I, Paszti J, Hardardottir H, Rossney A, Pan A, Pantosti A, Borg M, Grundmann H, Mueller-Premru M, Olsson-Liljequist B, Widmer A, Harbarth S, Schweiger A, Unal S, Kluytmans JA. Livestock-associated

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 502-505.

15. Uhlemann AC, Hafer C, Miko BA, Sowash MG, Sullivan SB, Shu Q, Lowy FD. Emergence of sequence type 398 as a community- and healthcare-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in northern Manhattan. *Clin Infect Dis* 2013; 57: 700-703.

16. Mediavilla JR, Chen L, Uhlemann AC, Hanson BM, Rosenthal M, Stanak K, Koll B, Fries BC, Armellino D, Schilling ME, Weiss D, Smith TC, Lowy FD, Kreiswirth BN. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398, New York and New Jersey, USA. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 700-702.

17. Rasigade JP, Laurent F, Hubert P, Vandenesch F, Etienne J. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1330.

18. Hernandez D, van der Mee-Marquet N, Kluytmans J, Donnio PY, Quentin R, Corvaglia AR, Francois P. Whole-Genome Sequences of *Staphylococcus aureus* ST398 Strains of Animal Origin. *Genome Announc* 2013; 1.

19. Schijffelen MJ, Boel CH, van Strijp JA, Fluit AC. Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 2010; 11: 376.

20. Christiansen MT, Kaas RS, Chaudhuri RR, Holmes MA, Hasman H, Aarestrup FM. Genome-wide high-throughput screening to investigate essential genes involved in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 survival. *PLoS One* 2014; 9: e89018.

21. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36: 309-332.

22. Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 502-505.

23. Bae T, Schneewind O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* 2006; 55: 58-63.

24. Joo HS, Cheung GY, Otto M. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulin derivatives. *J Biol Chem* 2011; 286: 8933-8940.

25. Joo HS, Otto M. The isolation and analysis of phenol-soluble modulins of *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol* 2014; 1106: 93-100.

26. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said-Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol* 2005; 175: 3907-3919.

27. Teixeira MM, Araujo MC, Silva-Carvalho MC, Beltrame CO, Oliveira CC, Figueiredo AM, Oliveira AG. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45: 637-643.

28. Caiaffa-Filho HH, Trindade PA, Gabriela da Cunha P, Alencar CS, Prado GV, Rossi F, Levin AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 518-520.

29. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, Chambers HF, Lu Y, Otto M. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5883-5888.

30. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 2007; 13: 1510-1514.

31. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Li M, Otto M. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* 2008; 32: 150-158.

32. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, DeLeo FR, Otto M. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect Dis* 2010; 202: 1866-1876.

33. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, Bubeck Wardenburg J, Schneewind O, Otto M, DeLeo FR. Comparative

analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 2011; 204: 937-941.

34. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, Sonnevend AM, Nagy E. alpha-Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 1139-1148.

35. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 2013; 5: 1140-1166.

36. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 667-673.

37. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. 2013.

38. Rello J, Torres A. Microbial causes of ventilator-associated pneumonia. *Semin Respir Infect* 1996; 11: 24-31.

39. Fry DE. The continued challenge of *Staphylococcus aureus* in the surgical patient. *Am Surg* 2013; 79: 1-10.

40. Athanassa Z, Siempos, II, Falagas ME. Impact of methicillin resistance on mortality in *Staphylococcus aureus* VAP: a systematic review. *Eur Respir J* 2008; 31: 625-632.

41. Cheung GY, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect* 2012; 14: 380-386.

42. Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, Barbian KD, McCarthy AJ, Street C, Hirschberg DL, Lipkin WI, Lindsay JA, DeLeo FR,

Lowy FD. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *mBio* 2012; 3.

43. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 178-182.

44. Chen Y, Yeh AJ, Cheung GY, Villaruz AE, Tan VY, Joo HS, Chatterjee SS, Yu Y, Otto M. Basis of virulence in a Panton-Valentine leukocidin-negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J Infect Dis* 2015; 211: 472-480.

45. da Cunha Mde L, Calsolari RA, Junior JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 381-390.

46. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128-1132.

47. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 2007; 28: 1711-1720.

48. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual

genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75: 408-413.

49. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2004; 72: 2177-2185.

50. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70: 631-641.

51. Marconi C, Cunha MLRS, Araujo Jr JP, Rugolo LMSS. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus* spp. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2004; 11: 117-128.

52. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2240-2244.

53. 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: 3374-3377.

54. 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: 1008-1015.

1 **Table 1**. Oligonucleotides used in this study.

Genes/Primer names	Primers	Reference
	For virulence gene detection	
sea	TTGGAAACGGTTAAAACGAA; GAACCTTCCCATCAAAAACA	(45)
seb	TCGCATCAAACTGACAAACG; GCAGGTACTCTATAAGTGCC	(45)
sec-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT; AAATCGGATTAACATTATCC	(45)
tst	ATGGCAGCATCAGCTTGATA; TTTCCAATAACCACCCGTTT	(45)
lukS-PV	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA; GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	(46)
icaA	CCCAAGCTTTAATTCTGTTATTGTTTTTGG; TGGCTGTATTAAGCGAAGTC	(47)
icaD	AAACGTAAGAGAGGTGG; GGCAATATGATCAAGATAC	(48)
bap	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG; GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	(49)
eta	CTAGTGCATTTGTTATTCAA; TGCATTGACACCATAGTACT	(50)
etb	ACGGCTATATACATTCAATT; TCCATCGATAATATACCTAA	(50)
hla	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG; CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	(50)
hlb	GTGCACTTACTGACAATAGTGC; GTTGATGAGTAGCTACCTTCA	(50)
hld	ATGGCAGCAGATATCATTTC; CGTGAGCTTGGGAGAGAC	(51)
mecA	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC; AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	(52)
	For SCCmec typing	
DCS F2, R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC; CTAAATCATAGCCATGACCG	(53)
mecA P4, P7	TCCAGATTACAACTTCACCAGG; CCACTTCATATCTTGTAACG	(53)
CIF2 F2, R2	TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG; ATTTACCACAAGGACTACCAGC	(53)
mecI P2, P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC; GCGGTTTCAATTCACTTGTC	(53)
RIF5 F10, R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG; GTCACAGTAATTCCATCAATGC	(53)
ccrC F2, R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG; ATAATGGCTTCATGCTTACC	(53)

Number	SCC*mec* *mecA*	Resistance	ST	Outcome	Type of infection	*lukS* *tsst* *hlA* *hlb* *hld* *eta* *etb* *sea* *seb* *sec* *bap* *icaA*	PSMα3[4]	α-toxin[5]	Protein A[5]
KDP F1, R1						AATCATCTGCCATTGGTGATGC; CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	(53)		
SCC*mec* V J1 F, R						TTCTCCATTCTTGTTCATCC; AGAGACTACTGACTTAAGTGG	(53)		
*ccrB*2 F2, R2						AGTTTCTCAGAATTCGAACG; CCGATATAGAAWGGGTTAGC	(53)		
SCC*mec* III J1 F, R						CATTTGTGAAACACAGTACG; GTTATTGAGACTCCTAAAGC	(53)		
						For MLST			
arcC						TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC; AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	(54)		
aroE						ATCGGAAATCCTATTTCACATTC; GGTGTTGTATTAATAACGATATC	(54)		
glpF						CTAGGAACTGCAATCTTAATCC; TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	(54)		
gmk						ATCGTTTTATCGGGACCATC; TCATTAACTACAACGTAATCGTA	(54)		
pta						GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG; GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	(54)		
tpi						TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA; TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	(54)		
yqiL						CAGCATACAGGACACCTATTGGC; CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	(54)		
						For spa typing			
spa						TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC; CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	(22)		
						For deletion of hla			
ST398HLAAttB1						GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAAGTCTTGTTATAATCGCATT TTTGTTTG			
ST398HLA1Rev						GAGTGTACATAACCATTTTTAAAACGATTTGAGGAAACAATAAT			
ST398HLA2Rev						TGGTTATGTACACTCAAATAGTCACA			
ST398HLAAttB2						GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAACATTAGAATACATAAATG AACAGTAAA			

1

2

A-01	-		none	15	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	1.77E+08	3.81E+07	7.81E+06
A-02	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	ICU discharge	HAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.81E+08	2.91E+07	3.84E+06
A-03	-		pen	188	Death		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.80E+08	3.14E+07	0.00E+00
A-04	+	I	eri (intermediate)	SLV2 140[2]	Death		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2.26E+08	2.66E+07	6.39E+07
A-06	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	ICU discharge	CAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	5.68E+07	0.00E+00	2.70E+07
A-07	-		pen	188	ICU discharge		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	9.75E+07	0.00E+00	3.61E+07
A-08	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	Death (*)[3]		-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2.40E+08	2.44E+07	9.77E+06
A-09	-		pen	5	Death	VAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.35E+07	0.00E+00	2.16E+07
A-10	-		oxa/cef/pen/eri/cli	105	Death		-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	2.07E+08	1.39E+07	0.00E+00
A-11	-		eri/cli *D-test pos.	398	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.51E+09	7.64E+07	0.00E+00
A-12	+	II	oxa/cef/pen/e	105	Death	VAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.05E+08	3.48E+06	2.51E+07

			ri/cli																						
A-13	-		pen	1635	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	4.69E+08	3.43E+07	8.71E+06
A-14	-		pen	1635	ICU discharge	CAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.17E+08	0.00E+00	3.23E+07
A-15	-		eri/cli *D-test pos.	1	Death (*)	VAP	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	1.94E+08	6.98E+06	2.18E+07
A-16	-		pen/eri /cli *D-test pos.	398	Death (*)	VAP	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.52E+09	4.93E+07	1.19E+06
A-17	+	II	oxa/cef /pen/e ri/cli	105	Death	CAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.71E+08	0.00E+00	1.40E+07
A-18	+	II	oxa/cef /pen/e ri/cli	SLV1489	ICU discharge	VAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.40E+08	0.00E+00	1.99E+07
A-19	-		eri/cli *D-test pos.	398	Death (*)	HAP	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	1.43E+09	4.10E+07	4.56E+05
A-20	+	II	oxa/cef /pen/e ri/cli	105	Death	VAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.22E+08	0.00E+00	2.20E+07
A-21	-		pen/eri /cli *D-test pos.	5	ICU discharge		-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	5.56E+08	2.56E+07	9.06E+05
A-22	+	II	oxa/cef /pen		Death	CAP	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	2.23E+07	1.25E+06	1.41E+07

A-23	+	IV	oxa/cef/pen	8	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.90E+09	3.84E+07	1.58E+06
A-24	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	ICU discharge	VAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	3.45E+06	0.00E+00	2.08E+07
A-25	-		pen	15	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.45E+09	9.97E+06	1.86E+07
A-26	-		pen	26	ICU discharge	CAP	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.31E+08	2.15E+07	0.00E+00
A-27	-		none	SLV546	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	4.38E+08	4.17E+07	0.00E+00
A-28	-		pen	188	Death	VAP	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.04E+09	1.97E+07	0.00E+00
A-29	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	Death (*)		-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.40E+08	2.06E+06	1.82E+07
A-31	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	ICU discharge	Trach.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	1.54E+08	6.14E+06	0.00E+00
A-32	-		none		Death (*)	HAP	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	6.69E+07	0.00E+00	4.92E+07
A-33	-		none	5	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	1.57E+08	0.00E+00	3.15E+07
A-36	-		pen	105	Death	HAP	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	4.35E+07	8.15E+06	2.25E+06
A-37	+	IV	pen/cef/oxa	188	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2.00E+09	2.72E+07	0.00E+00

A-38	+	II	pen/eri/cli/cef/oxa	105	Death (*)	VAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2.30E+08	4.21E+06	6.72E+06
A-39	-		pen	97	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	9.89E+07	3.27E+07	4.39E+06
A-40	+	IV	oxa/cef/pen	5	ICU discharge	VAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	1.01E+08	0.00E+00	2.89E+07
A-41	-		pen/eri/cli *D-test pos.	398	ICU discharge	HAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.11E+09	3.88E+07	0.00E+00
A-43	-		none	45	Death (*)		-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	9.67E+07	1.94E+06	7.36E+07
A-44	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	SLV105	Death (*)	HAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	2.04E+08	7.86E+06	0.00E+00
A-45	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	ICU discharge	CAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.60E+08	0.00E+00	3.03E+07
A-46	+	II	oxa/cef/pen/eri/cli	105	ICU discharge		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	5.00E+07	0.00E+00	1.48E+07
A-47	-		pen/eri/cli *D-test pos.	8	Death	VAP	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	1.82E+09	1.12E+07	3.34E+06
A-48	+	II	oxa/cef/pen	105	Death (*)	HAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	2.36E+06	0.00E+00	2.51E+07
A-49	+	II	oxa/cef/pen	105	ICU discharge		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	1.85E+08	1.24E+07	8.39E+06

A-50	-		none	20	ICU discharge	HAP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	6.76E+08	1.58E+07	0.00E+00
A-51	+	II	oxa/cef/pen	105	ICU discharge		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	2.94E+08	6.92E+06	9.92E+06
A-52	-		eri/cli/pen	398	Death (*)		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	1.39E+09	5.49E+07	0.00E+00

Table 2. Characteristics of *S. aureus* isolates[1]

[1]The entire obtained information is shown in Supplemental Table 1.

[2]SLV, single locus variant.

[3](*), Death due to pneumonia.

[4]by HPLC/MS, numbers represent area under peak values.

[5]by Western blot, numbers represent relative densitometry values.

Table 3. Brief case reports of patients with ST398 isolates.

Patient	Isolate	Brief case report
51 year-old male	A11	The patient presented at the ICU for occipital trauma. He developed fever, VAP, and urinary tract infection due to *E. coli*. The patient received oxacillin for 4 days. He was discharged after 4 days. The patient reported no animal contact.
39 year-old male	A16	The patient presented at the ICU for head trauma and pulmonary contusion. He developed skin and soft tissue infection, which was treated with cefepime and clindamycin. He died from pneumonia that developed within 48 hours of admission. This patient was a rural worker.
61 year-old male	A19	The patient presented at the ICU for chronic renal failure with acute worsening and necessity of dialysis. He was treated with amoxicillin and clavulanic acid due to sinusitis for 3 days after admission. Afterwards, the treatment was changed for imipenem and vancomycin due to VAP that he developed. The patient died from VAP. He reported no animal contact.
72 year-old male	A41	The patient presented to the ICU for upper gastrointestinal bleeding secondary to peptic ulcer. He developed no infection and was discharged. This patient was a rural worker.
76 year-old male	A52	The patient presented to the ICU for urinary tract infection with septic shock. He received imipenem, polymyxin E and linezolid. He died from HAP that was not associated with mechanical ventilation. He reported contact with pigs and poultry.

Conclusões

- Os principais agentes causadores de PAV nesse estudo foram *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.
- A incidência de PAV foi de 28,2 por 1000 ventiladores dia.
- *S. aureus* associados à PAV foram na maioria sensíveis à oxacilina e todos sensíveis à vancomicina, quinupristina-dalfopristina, tigeciclina, linezolida e daptomicina e os MRSA apresentando principalmente SCC*mec* tipos II e IV.
- Os genes de fatores de virulência mais frequentes foram *icaA, hla e hld*.
- *S. aureus* associados à PAV apresentaram variabilidade clonal, prevalecendo clones característicos da comunidade, o que sugere que o paciente desenvolve PAV pela própria cepa que carreia nas primeiras 72 horas de intubação.
- A presença de cepas produtoras de PSMbeta2, do gene *sea* e o paciente apresentar neoplasia sólida foram associados ao desenvolvimento de PAV por *S. aureus*.
- A presença dos genes *sea* e *hlb* foram associados ao desfecho óbito na PAV causada por *S. aureus.*
- Pneumonia associada à ventilação mecânica acomete prioritariamente pacientes com trauma, e pacientes que fizeram uso de antimicrobianos beta-lactâmicos (anti-pseudomonas).
- Trauma foi um fator de risco para o desfecho PAV causada por *S. aureus* e enterobactérias, sendo que na PAV por enterobactérias foram obtidos adicionalmente como fatores de risco o gênero feminino e doença do sistema

nervoso central. Procedimentos cirúrgicos foram negativamente associados à PAV causada por enterobactérias.

- Gênero masculino foi o único fator de risco para carreamento de *S. aureus* em pacientes em ventilação mecânica na UTI e a utilização de antibióticos beta-lactâmicos (não anti-pseudomonas) foi um fator protetor.
- Procedimentos cirúrgicos foi um fator de risco para o carreamento de MRSA em pacientes submetidos à ventilação mecânica e a doença do sistema nervoso central foi um fator protetor.
- Utilização de esteróides e a idade avançada foram fatores de risco para pacientes em ventilação mecânica serem colonizados por *A. baumannii.*
- A utilização de glicopeptídeos foi um fator protetor contra a PAV e esse achado tem aplicação prática na conduta clínica para o direcionamento de antibioticoterapia em pacientes adultos submetidos à ventilação mecânica.
- A alfa toxina foi um fator crucial no desenvolvimento de pneumonia para a linhagem ST398.

Anexo 1: ***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em pesquisa científica***

Projeto de Pesquisa: "Etiologia, Epidemiologia e prognóstico das Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica em um hospital de ensino, com ênfase no estudo molecular e virulência dos *Staphylococcus aureus*.".

Convido o Sr/Srª _____ para participar do projeto de pesquisa "Etiologia, Epidemiologia e prognóstico das Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica em um hospital de ensino, com ênfase no estudo molecular e virulência dos *Staphylococcus aureus*.". O objetivo da pesquisa é verificar qual é a bactéria que está causando a pneumonia nos pacientes hospitalizados que usam aparelho para respirar, verificar os fatores dos pacientes e da bactéria que agravam a doença e dificultam o tratamento. O procedimento feito pelo médico é uma aspiração da garganta do paciente, logo depois, eu a pesquisadora Mariana Fávero Bonesso, farei a pesquisa da bactéria do material por meio de cultivo. Solicito seu consentimento para participar ou permitir a participação do familiar nesta pesquisa, e também utilizar a bactéria isolada do material do exame colhido pelo médico sendo realizado pelo Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências (DMI-IB), e pedir sua permissão para utilizar os dados de identificação e informações básicas referentes à sua saúde. Suas informações serão utilizadas exclusivamente pela pesquisadora, que manterá sigilo sobre sua identidade podendo retirar seu consentimento a qualquer momento sem prejuízos ou danos ao seu acompanhamento no HC. A pesquisadora estará disponível para responder quaisquer perguntas e você poderá retirar seu consentimento em qualquer momento. Tendo sido satisfatoriamente informado sobre a pesquisa sob responsabilidade de Mariana Fávero Bonesso, orientada pela professora Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha responsável pelo Laboratório de Bacteriologia do DMI-IB da UNESP, e co-orientador Dr. Alessandro Lia Mondelli da Faculdade de Medicina da UNESP, declaro que concordo em participar da mesma, cedendo a bactéria isolada do material coletado e as informações clínicas do paciente. Esse documento será elaborado em 2 vias, uma ficando com você e outra com a pesquisadora, ambos devidamente assinados. Em caso de dúvidas entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo fone: 3811-6143.

Botucatu, _____de _____, 20___.

_____ _____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa ou responsável Assinatura da Pesquisadora

_____ _____

Nome do Sujeito da Pesquisa/Responsável Nome da Pesquisadora

Endereço e telefone do pesquisador: Rua Capitão Andrade, 270, Bairro Alto, Botucatu-SP. CEP: 18601- 200; tel. (14) 8172-7241. Contato da Orientadora: (14) 3811-6058 ou 6240 ramal 231.

Obrigada pela Colaboração!

Anexo 2 – **Ficha de Avaliação (Entrada)**

Nome:				
Cidade de residência:		**Estado:**	**RG(UNESP):**	
Idade:	**Origem da amostra:**	**LBA:** ◯ **TQ:** ◯	**HC:** ◯	**Outra:**
Sexo	**Feminino** ◯ **Masculino** ◯	**Número de entrada:**		
APACHE II		**Sim. Especificar.**	**Não se aplica/Não**	**Ignorado**
	Doenca cardíaca			
	Doenca pulmonar			
	Doenca renal			
	doenca hepática			
	Diabetes mellitus			
	Doenca do SNC			
	Neoplasia solida			
	Linfoma/leucemia			
	AIDS			
	Trauma			
Procedimentos				
	Cirurgia			
	Transplante			
	Neutropenia			
	Uso de esteroides			
	Uso de imunossupressores			
	Traqueostomia			
Dispositivos invasivos				
	Cateter venoso central			
	Sonda vesical de demora			
	Sondas nasogástricas/nasoenterais			
	Drenos			
	Presença de escara			
Sintomas clínicos				
	Febre			
	Antibióticos nos últimos 15 dias			
	Infecções			
	Culturas positivas			
	Precauções de isolamento pq?			

Anexo 3 - **Protocolo de Seguimento**

Identificação					
Data			**Dia do seguimento**		
Procedimentos			**Sim, especificar**	**Não/ não se aplica**	**Ignorado**
	Cirurgia				
	Transplante				
	Neutropenia				
	Uso de esteroides				
	Uso de imunossupressores				
	Traqueostomia				
Dispositivos invasivos					
	Cateter venoso central				
	Sonda vesical de demora				
	Sondas nasogastricas/nasoenterais				
	Drenos				
	Presença de escara				
Sintomas clínicos					
	Febre				
	Antibióticos nos últimos 15 dias				
	Infecções				
	Culturas positivas				
	Precauções de isolamento pq?				
Observações					
	Cultura				
Coleta	Positivo para:	Negativo			
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					