



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

Camila Sena Martins de Souza

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL E  
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*  
ISOLADOS DE PACIENTES VIVENDO COM  
HIV/AIDS E SEUS FAMILIARES

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

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

Coorientador: Prof. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu

2018

Camila Sena Martins de Souza

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL E  
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS  
DE PACIENTES VIVENDO COM HIV/AIDS E SEUS  
FAMILIARES

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

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

Coorientador: Prof. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu  
2018

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Souza, Camila Sena Martins de.

Determinação da relação clonal e virulência de  
*Staphylococcus aureus* isolados de pacientes vivendo com  
HIV/aids e seus familiares / Camila Sena Martins de Souza.  
- Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza  
Capes: 21201021

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Fatores de virulência. 3.  
AIDS (Doença). 4. HIV (Vírus). 5. Eletroforese em campo  
pulsado.

Palavras-chave: MLST; PFGE; *Staphylococcus aureus*; fatores  
de virulência; pessoa vivendo com HIV/aids.

**Camila Sena Martins de Souza**

Determinação da relação clonal e virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de  
pacientes vivendo com HIV/aids e seus familiares

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Comissão examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Adj. Lenice do Rosário de Souza

Faculdade de Medicina de Botucatu

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriana Gonçalves de Oliveira

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Titular Eduardo Bagagli

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Valéria Pereira Catanelli

Universidade do Oeste Paulista

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

***Aos meus pais, Cicero Martins de Souza e Veronica Sena Barbosa Souza***

*Obrigada por não medirem esforços em todos os momentos  
e tornarem possível a realização de mais um sonho.*

*Dedico a vocês todas as minhas conquistas.*

***A Luiz Domingues de Almeida Júnior***

*Obrigada por ser meu porto seguro, meu apoio e por seu companheirismo  
durante este longo período, sem você tudo seria mais difícil.*

*A Deus pelas oportunidades de crescimento concedidas a cada dia e por ser a luz que me guia quando parece não haver saída.*

*Ao meu querido irmão, Raphael Sena Martins de Souza, pelo carinho e torcida constante em todos os meus objetivos de vida.*

*A querida Prof. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha por ser a primeira a me abrir as portas há dez anos acreditando no meu trabalho, por ser a responsável pela minha formação acadêmica e simplesmente por entender minhas decisões e ausências durante o período que realizei outra graduação. Simples palavras não são capazes de expressar tamanha gratidão por me permitir chegar até aqui. Meu eterno carinho e agradecimento.*

*Ao Prof. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza pela ideia inicial do projeto.*

*Ao Prof. Dr. Cassiano Victória pela atenção e análises de georreferenciamento.*

*A banca de qualificação, Lenice do Rosário de Souza e Ary Fernandes Júnior, pela valiosa contribuição para o trabalho.*

*A Letícia Chamma Lastoria por todo o companheirismo e convivência agradável durante este período. Este trabalho não seria possível sem a sua dedicação. Meu eterno agradecimento.*

*A Thais Alves Barbosa por tornar os dias difíceis mais fáceis, pelo sorriso no momento de tristeza, pelo abraço que trouxe conforto, por compartilhar das minhas conquistas e por simplesmente me oferecer sua pura e verdadeira amizade. “Amigos nos tornam seres mais felizes pelo simples fato de existirem e serem nossos amigos”.*

*A Nathalia Bibiana Teixeira, por inúmeras vezes me ajudar no final desta etapa. Muito obrigada, minha querida amiga.*

*A querida amiga, Mônica da Silveira, por seu constante apoio em todos os momentos desta caminhada.*

*Agradeço de forma muito carinhosa a Profª. Drª. Teruê Sadatsume por deixar de ser somente professora e se tornar uma amiga. Muito obrigada pela torcida, carinho e alegria transmitida durante os últimos dez anos de convivência. Carinho, admiração e gratidão resumem o que sinto.*

*Aos queridos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial Luiz dos Santos, Larissa Ragozo e Ana Claudia Acerra pela ajuda em todos os momentos e carinhosa amizade construída no decorrer desses anos.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio disponibilizado, essencial para a realização deste trabalho.*

*Gostaria de expressar meu reconhecimento a todos que de diversas maneiras contribuíram não apenas para a realização deste trabalho, mas também por participarem desta conquista. Na impossibilidade de nomear cada um, deixo meu agradecimento pela contribuição e que de alguma maneira encontrem aqui minha expressão de amizade e reconhecimento.*

*O êxito começa no exato momento  
em que o homem decide o que quer e  
começa a trabalhar para consegui-lo.*

*Roberto Flávio C Silva*



## RESUMO

Indivíduos colonizados podem contribuir para disseminação de *Staphylococcus aureus*, que se destaca por sua patogenicidade e alta frequência, capaz de produzir doenças tanto em indivíduos sadios quanto em imunocomprometidos, sendo esse risco aumentado na imunodeficiência humana (HIV/aids). Esse estudo teve como objetivos determinar a relação clonal de MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina) e MSSA (*Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina) entre as cepas isoladas de pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e seus contactantes domiciliares, e os fatores de virulência que podem contribuir para o carregamento desses micro-organismos. *S. aureus* foram isolados da nasofaringe e orofaringe de 368 PVHA do Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAE/DAM) do complexo da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e Fundação para o Desenvolvimento Médico Hospitalar (FAMESP), sendo 112 residentes em Botucatu e 256 provenientes de cidades da região. A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi utilizada para detecção do gene *mecA*, genes das enterotoxinas (*sea*, *seb*, e *sec-1*), esfoliatinas A e B (*eta* e *etb*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina Pantón–Valentine (*lukS-PV* e *lukF-PV*), hemolisinas alfa e delta (*hla* and *hld*) e biofilme (*icaA* e *icaD*) e para tipagem do SCC*mec*. Para a tipagem molecular foi utilizado a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *spa Typing*. Os pacientes residentes em Botucatu foram convidados a mais duas coletas com inclusão dos contactantes domiciliares, totalizando 73 contactantes. Além disso, foi realizado o georreferenciamento dos domicílios no momento da coleta da área urbana de Botucatu. A prevalência de colonização por *S. aureus* na primeira coleta foi de 26%, com dez indivíduos colonizados com MRSA, com a taxa de prevalência de 2,7%. Na segunda coleta a prevalência foi de 23,8%, com a presença de três isolados de MRSA, já entre os contactantes domiciliares foi de 30%, com a identificação de quatro MRSA. E por fim, terceira e última coleta a prevalência encontrada foi de 25,3% com dois MRSA. Do total de 178 isolados de *S. aureus*, 19 (10,6%) eram carregadores do gene *mecA*, dentre esses, quatro eram provenientes de contactantes domiciliares, com prevalência do SCC*mec* Tipo IV. A identificação do perfil clonal através da análise por PFGE evidenciou a presença de 2 *clusters* majoritários entre os MRSA e 10 *clusters* entre os isolados sensíveis, demonstrando possíveis transmissões no ambiente familiar. Quando realizada análise pelo MSLT identificou-se a presença de um mesmo clone em cidades

distintas sugerindo ampla disseminação do clone no Estado de São Paulo. Encontramos *S. aureus* isolados dos pacientes bem distribuídos em toda a cidade de Botucatu, no entanto, os isolados MRSA não foram encontrados na região central da cidade. Além disso, os resultados demonstraram uma prevalência significativa de genes de virulência nos isolados, com destaque para genes das hemolisinas e genes para produção de biofilme. Em relação ao georreferenciamento, observamos uma distribuição de *S. aureus* em toda a cidade de Botucatu, porém, a prevalência maior de MRSA encontra-se na região norte da cidade. A análise do perfil clonal leva a maiores discussões sobre o processo de evolução da bactéria, sugerindo uma provável origem comum entre as cepas de diferentes cidades.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, fatores de virulência, pessoa vivendo com HIV/aids, PFGE, MLST.

## ABSTRACT

Colonized individuals may contribute to the dissemination of *Staphylococcus aureus*, which stands out for its pathogenicity and high frequency, capable of producing diseases in both healthy and immunocompromised individuals, with an increased risk of human immunodeficiency (HIV/AIDS). This study aimed to determine the clonal relationship between MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) and MSSA (Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*) between strains isolated from people living with HIV/aids (PLHA) and their home contacts, and virulence factors which may contribute to the transport of these microorganisms. *S. aureus* were isolated from the nasopharynx and oropharynx of 368 PLHA from the Specialized Outpatient Services “Domingos Alves Meira” (SAE/DAM) of the Botucatu Medical School (FMB) and Hospital Medical Development Foundation (FAMESP), of which 112 were residents in Botucatu and 256 from cities in the region. The PCR (Polymerase Chain Reaction) technique was used to detect the *mecA* gene, enterotoxin genes (*sea*, *seb*, and *sec-1*), esfoliatins A and B (*eta* and *etb*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), Pantón-Valentine leukocidin (*lukS*-PV and *lukF*-PV), alpha and delta hemolysins (*hla* and *hld*) and biofilm (*icaA* and *icaD*) and for typing SCC*mec*. For molecular typing were used techniques of the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST) and spa Typing. The patients residing in Botucatu were invited to more two collections with the inclusion of the home contacts, totaling 73 home contacts. In addition, the georeferencing of households was carried out at the time of collection of the urban area of Botucatu. The prevalence of *S. aureus* colonization in the first collection was 26%, with ten individuals colonized with MRSA, with a prevalence rate of 2.7%. In the second collection the prevalence was 23.8%, with the presence of three MRSA isolates; among the home contacts, 30% were identified, with the identification of four MRSA. Finally, the third and final collection was found to be 25.3% with two MRSA. Of the total of 178 *S. aureus* isolates, 19 (10.6%) were carriers of the *mecA* gene, of which four were from home contacts, with prevalence of SCC*mec* Type IV. The identification of the clonal profile through PFGE analysis evidenced the presence of two major clusters between MRSA and 10 clusters among the sensitive isolates, demonstrating possible transmissions in the family environment. When MSLT analysis was performed, the presence of a same clone was identified in distinct cities, suggesting a wide dissemination of the clone in the State of São Paulo. We found *S. aureus* isolated

from patients well distributed throughout the city of Botucatu, however, MRSA isolates were not found in the central region of the city. In addition, the results demonstrated a significant prevalence of virulence genes in the isolates, with emphasis on hemolysin genes and genes for biofilm production. Regarding georeferencing, we observed a distribution of *S. aureus* throughout the city of Botucatu, however, the highest prevalence of MRSA is found in the northern region of the city. The analysis of the clonal profile leads to further discussions about the process of evolution of the bacteria, suggesting a probable common origin among the strains of different cities.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, people living with HIV/aids

## Lista Tabelas

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção dos genes 16S e SA442.....              | 12 |
| Tabela 2. Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mecA</i> .....               | 13 |
| Tabela 3. Oligonucleotídeos para a detecção do SCC <i>mec</i> .....                 | 14 |
| Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de genes de virulência ..... | 15 |
| Tabela 5. Sequência de <i>primers</i> utilizados na PCR.....                        | 17 |
| Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene <i>spa</i> .....     | 18 |

## SUMÁRIO

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>           | <b>05</b> |
| <b>2. Objetivos.....</b>             | <b>09</b> |
| 2.1 Objetivo Geral .....             | 09        |
| 2.2 Objetivo Específico .....        | 09        |
| <b>3. Materiais e Métodos .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>4. Referências .....</b>          | <b>19</b> |
| <b>5. Apresentação da tese .....</b> | <b>23</b> |
| 5.1 Artigo I .....                   | 24        |
| 5.2 Artigo II .....                  | 46        |
| <b>6. Conclusão .....</b>            | <b>63</b> |
| <b>ANEXO I .....</b>                 | <b>64</b> |
| <b>ANEXO II.....</b>                 | <b>65</b> |

## 1. Introdução

Poucos agravos à saúde, como a aids, acumularam, em tão pouco tempo, um grande número de estudos para compreender seu comportamento e determinantes, o que demonstra sua importância, já que afeta a qualidade de vida da população causando um grande impacto na economia, na sociedade e nas estruturas familiares.<sup>1,2</sup>

O Brasil foi um dos primeiros países, dentre os de baixa e média renda a fornecer tratamento gratuito, a partir de 1996, para pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA) pelo Sistema Único de Saúde (SUS), levando a uma queda acentuada na taxa de mortalidade associada à aids.<sup>3</sup>

Atualmente, conta com uma das maiores coberturas de tratamento antirretroviral (TARV) entre os países de média e baixa renda e o sucesso do programa brasileiro de controle do HIV/aids é reconhecido mundialmente devido a sua abordagem que inclui a prevenção e o acesso universal e gratuito às drogas antirretrovirais. Em junho de 2017, 20,9 milhões tinham acesso à terapia antirretroviral.<sup>4,5</sup>

Estima-se que 36,7 milhões de pessoas em todo o mundo viviam com HIV em 2016, sendo que 1,8 milhão foram novas infecções pelo HIV ocorridas no ano de 2016. Além disso, 1 milhão de pessoas morreram em 2016 por causas relacionadas à aids.<sup>4</sup>

Pessoas colonizadas podem apresentar risco de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) aumentado em PVHA, além de contribuírem para sua disseminação, embora a prevalência de colonização neste grupo ainda não esteja bem estabelecida.<sup>6</sup>

Segundo Hidron e colaboradores<sup>7</sup> a resposta imune inata em pessoas com HIV apresenta disfunção significativa de neutrófilos o que pode aumentar o risco de infecções bacterianas.

A neutropenia é uma consequência do HIV e se torna um fator de risco significativo para infecções bacterianas em PVHA, uma vez que neutrófilos são um componente crítico na imunidade inata e a primeira célula de defesa contra *S. aureus*.<sup>8,9</sup>

Estudos já demonstraram que a tipagem de *S. aureus* de sítios infectados foi na maioria das vezes a mesma cepa observada previamente na cultura das narinas, demonstrando que *S. aureus* nas narinas serve de reservatório para colonização em outros sítios.<sup>10</sup>

As razões para elevadas taxas de colonização são multifatoriais, mas provavelmente estão relacionadas ao estilo de vida, como atividades sexuais de alto

risco e uso de droga, além disso, disfunção do sistema imune e frequente exposição ao uso de antibióticos e hospitalizações.<sup>11</sup>

Estudos têm demonstrado que PVHA têm um risco aumentado para colonização por micro-organismos patogênicos, principalmente quando relacionado ao *S. aureus* e consequentemente a ocorrência de infecções, incluindo bacteremias, endocardites e infecções graves de pele devido aos fatores de virulência desse micro-organismo e pela sua resistência aos antibióticos.<sup>12,13</sup>

*S. aureus* é causa frequente de infecções na comunidade e no hospital, sua resistência a vários antibióticos dificulta o tratamento.<sup>14</sup> Destaca-se por sua patogenicidade e alta frequência, causando doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em sadios por sua fácil disseminação e sua enorme capacidade de adaptação e resistência a antibióticos.<sup>15</sup>

A colonização assintomática por *S. aureus* tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecção por contato.<sup>16</sup>

O principal nicho ecológico de *S. aureus* são as narinas, no entanto em muitos casos, a colonização não é restrita às narinas, pois estudos já demonstraram a importância da orofaringe como um local comum de colonização, com isso indivíduos podem ser colonizados exclusivamente na orofaringe e estes seriam perdidos em estudos de portadores com coletas limitadas às narinas.<sup>14,17</sup>

Segundo Reinato e colaboradores<sup>18</sup> para se pesquisar *S. aureus* e, especialmente, MRSA, um dos sítios de maior interesse é a mucosa nasal, pela própria característica de sua colonização natural.

Estudos realizados por Padoveze e colaboradores<sup>19</sup> sugerem que a aquisição da colonização nasal por MRSA está relacionada a hospitalização em unidade de doenças infecciosas e frequente assistência à saúde em ambulatorios de cuidados diários de pacientes com HIV/aids, demonstrando a necessidade de vigilância em ambulatorios, devido às possíveis implicações da disseminação de organismos resistentes, como MRSA.

Alguns estudos relatam a associação de baixos níveis de linfócitos TCD4<sup>+</sup> como outro fator de risco para infecção por MRSA, o que pode ser aumentado por imunodeficiência desempenhando um papel importante no aumento do risco para



infecções por MRSA e estabelecimento de maiores taxas de colonização entre esta população de pacientes.<sup>7,20,21</sup>

*S. aureus* produz algumas exotoxinas como a toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e as toxinas esfoliativas (ETs). Todas essas toxinas são conhecidas como superantígenos por terem a capacidade de estimular a proliferação inespecífica de linfócitos T e produção exacerbada de citocinas, que são responsáveis pelas manifestações clínicas observadas nas infecções graves causadas por cepas toxigênicas.<sup>22</sup>

A leucocidina Pantón Valentine (PVL) é uma toxina formadora de poros codificada pelos genes *LukS-PV* e *lukF-PV* e que causam destruição de leucócitos e necrose do tecido. Cepas produtoras de PVL têm sido associadas com a formação de abscesso na pele, furunculose e casos graves de pneumonia necrotizante.<sup>23</sup>

As hemolisinas são citotoxinas secretadas por *S. aureus* que apresentam atividade hemolítica, ou seja, capacidade de formar poros na membrana de células do sistema imune, atividade dermonecrótica importante em infecções de pele e efeitos neurotóxicos.<sup>15</sup>

Além de expressar diversos fatores de virulência, *S. aureus* tem capacidade de formar biofilme na superfície de materiais estranhos ao organismo, como cateteres endovenosos e próteses, que protegem esses micro-organismos da ação de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro dificultando o tratamento.<sup>24</sup>

Além da expressão dos fatores de virulência, a patogenicidade de *S. aureus* também se deve à ampla resistência antimicrobiana entre os isolados, fator que dificulta de forma considerável o tratamento das infecções em âmbito mundial.<sup>25</sup>

O gene *mecA* está localizado em um complexo genético móvel chamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). Até o momento, onze tipos de SCC*mec* têm sido descritos para *S. aureus*, utilizando a combinação de duas partes: o complexo *ccr* e o complexo *mec*, com três genes *ccr* filogeneticamente distintos classificados como: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, além disso, há seis classes do complexo gene *mec* (classe A, B, C1, C2, D e classe E), sendo que na classe D não temos nenhum SCC*mec* descrito até o momento.<sup>26,27</sup>

Nas últimas décadas, uma variedade de técnicas moleculares baseadas no estudo da similaridade dos cromossomos foi desenvolvida, dentre elas se destacam o *Pulsed-Field Gel Eletrophoresis* (PFGE), considerado padrão-ouro para a tipagem molecular; o

*Multilocus Sequence Typing* (MLST), que tem sido amplamente utilizado para caracterização molecular e investigação epidemiológica e o *spa Typing*.<sup>28,29,30</sup>

Estudos mostram que PFGE e *spa typing* possuem um alto poder discriminatório com uma concordância de 95,9% na classificação do tipo de isolado e ambos os métodos também mostram alta concordância com o MLST (95,5%). A técnica de *spa typing* e MLST compartilham as vantagens de resultados inequívocos que podem ser comparados entre laboratórios ao longo do tempo.<sup>31,32</sup>

As infecções por *S. aureus* entre a população em geral estão bem descritas, mas pouco se sabe sobre a incidência de colonização, infecção, persistência e transmissão intradomiciliar de MRSA e MSSA em PVHA, um agravo preocupante com grande impacto na saúde. Esse estudo se justifica pela perspectiva de que a partir dos resultados obtidos podem ser realizadas intervenções visando a redução do risco de adoecimento, bem como redução do risco de transmissão da bactéria entre PVHA, família e a equipe de assistência à saúde.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar a relação clonal de MRSA e MSSA entre as cepas isoladas de PVHA e seus familiares e os fatores de virulência associados à disseminação desses clones entre pacientes e familiares que podem contribuir para o carreamento desses micro-organismos.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Investigar o carreamento nasal e oral de *S. aureus*
- Determinar a relação clonal entre as cepas provenientes da cavidade nasal e da orofaringe
- Identificar a intensidade da troca de cepas entre os contactantes e a PVHA
- Detectar os fatores de virulência que conferem vantagem à troca intradomiciliar
- Realizar o georreferenciamento para determinação da distribuição dos clones identificados no estudo.

### 3. Materiais e Métodos

#### Grupo de estudo

As amostras utilizadas foram previamente coletadas e isoladas em projeto anterior intitulado: "Colonização por *Staphylococcus aureus* em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas em um serviço ambulatorial de referência em Botucatu (SP): prevalência, resistência à meticilina, e epidemiologia espacial e molecular" e encontram-se estocadas no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociência de Botucatu (UNESP).

O estudo foi realizado através de um delineamento transversal. Os isolados são provenientes da nasofaringe e orofaringe de 368 (112 residentes na cidade de Botucatu e 256 residentes em cidades da região) pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) acima de 15 anos que estavam frequentando regularmente o Serviço de Ambulatórios Especializados “Domingos Alves Meira” (SAE/DAM) do Complexo da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Fundação para o Desenvolvimento Médico Hospitalar (FAMESP) e concordaram participar do estudo. Não houve critério de exclusão específico. No entanto, devido a restrições da legislação de ética não poderíamos incluir indivíduos privados de liberdade no estudo.

As PVHA que participaram do estudo eram das cidades de Avaré, Cerqueira César, Itatinga, Pardinho, Bofete, Piraju, Fartura, Taguaí, Taquarituba, Itaí, Paranapanema, Itaporanga, Itapeva, Itapetininga, Tatuí, São Pedro do Turvo, Iaras, São Paulo, Capivari, Laranjal Paulista, Pereiras, Conchas, Anhembi, São Manuel, Areiópolis, Macatuba, Jaú, Brotas, Araraquara, Holambra e Birigui.

Além disso, foi realizada a busca de contactantes no domicílio de cada paciente residente na cidade de Botucatu. Uma visita domiciliar foi agendada após a inclusão no estudo. Durante a visita foi realizada a coleta de *swab* nasal e da orofaringe de todos os contactantes domiciliares, a segunda coleta do paciente devido a facilidade de já se encontrar no domicílio, e por fim o georreferenciamento do domicílio das famílias.

A terceira pesquisa dos pacientes foi realizada no ambulatório em retorno agendado para consultas médicas de rotina (em média, 3 meses após o primeiro levantamento). O fluxograma de coleta se encontra no **Anexo I**.

A coleta das PVHA residentes na região foi devido a possibilidade de uma melhor análise em relação a todos que estavam em atendimento no ambulatório.

Na primeira coleta realizada no ambulatório obtivemos o total de 736 *swabs* (nasal e oral de PVHA residentes na cidade de Botucatu e na região), 134 na segunda coleta realizada nos domicílios das PVHA residentes na cidade de Botucatu e 146 *swabs* (nasal e oral) dos contactantes, e por fim na terceira coleta 126 *swabs* (nasal e oral) das PVHA residentes na cidade de Botucatu, totalizando 996 *swabs* (nasal e oral) provenientes de PVHA e 146 de contactantes.

É importante esclarecer que para o cálculo da prevalência de carreamento a PVHA que carregava *S. aureus* em ambos sítios de coleta (nasal e oral) com o mesmo perfil no PFGE foi contabilizado um único isolado de *S. aureus*.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (número do parecer: 1.168.173). Um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os sujeitos do estudo.

Como limitações do estudo podemos citar a ausência do acompanhamento dos pacientes residentes em cidades da região devido à dificuldade de coleta, o que possibilitaria melhor investigação da evolução dos perfis clonais e disseminação na região.

### **Local de estudo**

O Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAE/DAM) do complexo da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Fundação para o Desenvolvimento Médico Hospitalar (FAMESP) está localizado na cidade de Botucatu (aproximadamente 130.000 habitantes; 22° 53' 09" S, 48° 26' 42" W) e é o único centro de referência da região compreendendo 500.000 pessoas. Dedicar-se à atenção ambulatorial à aids e hepatites virais crônicas para pacientes adultos. Possui diversos ambulatórios e serviços de atendimento não médico, como odontológico e psicológico entre outros.

### **Identificação de *Staphylococcus aureus***

Os micro-organismos foram submetidos à coloração pelo método de Gram objetivando-se a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram realizadas as provas de catalase e coagulase em tubo e as provas bioquímicas maltose, trealose e manitol para diferenciação de *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.<sup>33,34</sup>

A confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada através da detecção do gene que codifica o RNAr 16S e o fragmento de DNA SA442. Os *primers* utilizados são descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos para a detecção dos genes RNA16S e SA442.

| <b>Primer</b> | <b>Sequência de nucleotídeos</b>        | <b>Produto amplificado</b> |
|---------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| 16S RNAr 1    | CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G       | 791                        |
| 16S RNAr 2    | CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG         |                            |
| SA442 1       | AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG | 241                        |
| SA442 2       | CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA |                            |

Fonte: Mason et al<sup>35</sup>, Martineau et al<sup>36</sup>

### Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados obtidos através da técnica de disco difusão a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI*. As drogas utilizadas foram: Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Linezolida (30µg), Quinupristina/Dalfopristina (15µg), Sulfametoxazol/Trimetoprim (25 µg). A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI.<sup>37</sup>

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM de Vancomicina foi avaliada através do método de E-test. Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza tiras de plástico inerte e transparente, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, na qual é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado.

Os resultados da CIM foram denominados sensível, intermediário ou resistente de acordo com as definições pré-estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI*.<sup>38</sup>

### Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído de *S. aureus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a

37°C por 24 horas.

Para a extração foi utilizado o *Kit Illustra* (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a -20°C.

#### **Deteccção do gene *mecA* de resistência à metilicina**

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al.<sup>39</sup> Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

| <b>Primer</b> | <b>Sequência de nucleotídeos</b> | <b>Produto amplificado</b> |
|---------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>mecA1</i>  | AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGGC     | 533 pb                     |
| <i>mecA2</i>  | AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTGC     | 533 pb                     |

Fonte: Murakami et al.<sup>39</sup>

#### **Determinação do tipo de SCC*mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*)**

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se o método de reação de PCR Multiplex, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>40</sup> e atualizado por Milheiriço et al<sup>41</sup>.

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.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos para a detecção do SCCmec

| <i>Primer</i>   | Sequência de nucleotídeos 5'a 3'  | SCCmec/Região J                   | Tamanho |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|
| <i>dcs</i> F2   | 5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3'    | I, II, IV e VI,<br>região J3      | 342     |
| <i>dcs</i> R1   | 5' – CTAAATCATAGCCATGACCG – 3'    |                                   |         |
| <i>mecA</i> P4  | 5' – TCCAGATTACAACCTCACCAGG – 3'  | Controle interno<br>positivo      | 162     |
| <i>mecA</i> P7  | 5' – CCACTTCATATCTTGTAACG – 3'    |                                   |         |
| <i>cif2</i> F2  | 5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3' | I, região J1                      | 495     |
| <i>cif2</i> R2  | 5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'  |                                   |         |
| <i>mecI</i> P2  | 5' – ATCAAGACTTGCATTTCAGGC – 3'   | II e III,<br>complexo <i>mec</i>  | 209     |
| <i>mecI</i> P3  | 5' – GCGGTTTCAATTCATTGTC – 3'     |                                   |         |
| <i>rif5</i> F10 | 5' – TTCTTAAGTACACGCTGAATCG – 3'  | III, região J3                    | 414     |
| <i>rif5</i> R13 | 5' – GTCACAGTAATTCCATCAATGC – 3'  |                                   |         |
| <i>ccrC</i> F2  | 5' - GTACTCGTTACAATGTTTGG – 3'    | V, complexo <i>ccr</i>            | 449     |
| <i>ccrC</i> R2  | 5' – ATAATGGCTTCATGCTTACC – 3'    |                                   |         |
| <i>kdp</i> F1   | 5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3'  | II, região J1                     | 284     |
| <i>kdp</i> R1   | 5' – CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG – 3'  |                                   |         |
| SCCmec V J1 F   | 5' - TTCTCCATTCTTGTTTCATCC – 3'   | V, região J1                      | 377     |
| SCCmec V J1 R   | 5' – AGAGACTACTGACTTAAGTGG – 3'   |                                   |         |
| <i>ccrB2</i> F2 | 5' – AGTTTCTCAGAATTCGAACG – 3'    | II and IV,<br>complexo <i>ccr</i> | 311     |
| <i>ccrB2</i> R2 | 5' – CCGATATAGAAWGGGTTAGC – 3'    |                                   |         |
| SCCmec III J1 F | 5' – CATTTGTGAAACACAGTACG – 3'    | III, região J1                    | 243     |
| SCCmec III J1 R | 5' – GTTATTGAGACTCCTAAAGC – 3'    |                                   |         |

Fonte: Oliveira e Lencastre<sup>40</sup>, Milheiriço et al<sup>41</sup>

### Detecção dos genes de virulência

As reações de PCR para os genes das hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), assim como os *primers* utilizados, foram realizadas de acordo com Marconi et al<sup>42</sup>. As reações de amplificação dos genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), e para o gene da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) foram realizadas segundo Cunha et al<sup>43</sup> e Johnson et al<sup>44</sup>. As reações para o gene leucocidina Panton-Valentine (*pvl*) e genes das toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*), conforme descrito por Tristan et al<sup>45</sup> e Koning et al<sup>46</sup>. Amplificação dos genes *icaA* e *icaD*, relacionados com a produção de biofilme, foi realizada conforme descrito por Arciola et al.<sup>47</sup>



**Tabela 4.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de genes de virulência.

| Fator de virulência           | Gene        | Iniciador | Sequência (5'-3')           | Produto | Controle |
|-------------------------------|-------------|-----------|-----------------------------|---------|----------|
| Enterotoxina A                | <i>sea</i>  | SEA-1     | TTGGAAACGGTTAAAACGAA        | 120pb   | ATCC     |
|                               |             | SEA-2     | GAACCTTCCATCAAAAACA         |         | 13565    |
| Enterotoxina B                | <i>seb</i>  | SEB-1     | TCGCATCAAAGTGACAAACG        | 478pb   | ATCC     |
|                               |             | SEB-2     | GACGGTACTCTATAAGTGCC        |         | 14458    |
| Enterotoxina C                | <i>sec</i>  | SEC-1     | GACATAAAAGCTAGGAATTT        | 257pb   | ATCC     |
|                               |             | SEC-2     | AAATCGGATTAACATTATCC        |         | 19095    |
| Tox. 1 da Sínd. Choque Tóxico | <i>tst</i>  | TSST-1    | ATGGCAGCATCAGCTTGATA        | 350pb   | N315     |
|                               |             | TSST-2    | TTTCCAATAACCAACCCGTTT       |         |          |
| Biofilme                      | <i>icaA</i> | ICAA-1    | TCTCTTGCAGGAGCAATCAA        | 188pb   | ATCC     |
|                               |             | ICAA-2    | TCAGGCACTAACATCCAGCA        |         | 35983    |
|                               | <i>icaD</i> | ICAD-1    | ATGGTCAAGCCCAGACAGAG        | 198pb   | ATCC     |
|                               |             | ICAD-2    | CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA     |         | 35983    |
| Toxina Esfoliativa A          | <i>eta</i>  | ETA-1     | CTAGTGCATTTGTTATTCAA        | 119pb   | N5       |
|                               |             | ETA-2     | TGCATTGACACCATAGTACT        |         |          |
| Toxina Esfoliativa B          | <i>etb</i>  | ETB-1     | ACGGCTATATACATTCAATT        | 200pb   | ZM       |
|                               |             | ETB-2     | TCCATCGATAATATACCTAA        |         |          |
| Hemolisina $\alpha$           | <i>hla</i>  | HLA-1     | CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG | 209pb   | N315     |
|                               |             | HLA-2     | CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT    |         |          |
| Hemolisina $\delta$           | <i>hld</i>  | HLD-1     | ATGGCAGCAGATATCATTTT        | 357pb   | N315     |
|                               |             | HLD-2     | CGTGAGCTTGGGAGAGAC          |         |          |

### Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com *Syber safe* e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

### PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

A tipagem por PFGE foi realizada segundo o protocolo modificado de McDougal et al.<sup>28</sup> As amostras foram colocadas em caldo BHI para o crescimento durante 24 horas. Em um microtubo, foram adicionados 400µl da amostra e centrifugada à 12.000rpm por 50 segundos. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Após agitação em

vortex, foram adicionados 5µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose *low melt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*, *Fermentas Life Science*, Canadá). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (*New England BioLabs*) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,25 e 0,5% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice  $\geq 80\%$  foi escolhido para determinação dos *clusters*.

### **MLST – Multilocus Sequence Typing**

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al.<sup>30</sup> Cada par de *primer* amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb), estes são demonstrados na **Tabela 5**: carbamatoquinase (*arcc*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glp*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*).

A purificação foi realizada pelo *Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e a reação de sequenciamento é descrita abaixo. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>) (2004).

**Tabela 5.** Sequência de *primers* utilizados na PCR

| Gene                                 | Iniciador       | Sequência (5'-3')       | Tamanho do produto Amplificado (pb) |
|--------------------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Carbamato quinase                    | <i>arcC</i> -Up | TTGATTACACCAGCGGTATTGTC | 570                                 |
|                                      | <i>arcC</i> -Dn | AGGTATCTGCTTCAATCAGCG   |                                     |
| Desidrogenase do chiquimato          | <i>aroE</i> -Up | ATCGGAAATCCTATTTACATTC  | 536                                 |
|                                      | <i>aroE</i> -Dn | GGTGTTGTATTAATAACGATATC |                                     |
| Glicerol quinase                     | <i>glpF</i> -Up | CTAGGAAGTCAATCTTAATCC   | 534                                 |
|                                      | <i>glpF</i> -Dn | TGGTAAATCGCATGTCCAATTC  |                                     |
| Guanilato quinase                    | <i>gmk</i> -Up  | ATCGTTTTATCGGGACCATC    | 488                                 |
|                                      | <i>gmk</i> -Dn  | TCATTAACATAACGTAATCGTA  |                                     |
| Fosfato acetiltransferase            | <i>pta</i> -Up  | GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG | 575                                 |
|                                      | <i>pta</i> -Dn  | GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA |                                     |
| Triose-fosfato isomerase             | <i>tpi</i> -Up  | TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA | 475                                 |
|                                      | <i>tpi</i> -Dn  | TTTGACCTTCTAACAATTGTAC  |                                     |
| Acetil coenzima A acetil transferase | <i>yqiL</i> -Up | CAGCATACAGGACACCTATTGGC | 598                                 |
|                                      | <i>yqiL</i> -Dn | CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC |                                     |

Fonte: Enright et al<sup>30</sup>

### Reação de sequenciamento

As reações foram realizadas em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelos programas Mega, Laser Gene e *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

### *spa typing*

O *spa typing* foi realizado segundo as normas descritas por Shopsisin et al<sup>29</sup>, utilizando um controle negativo (água destilada estéril) e um controle positivo (ATCC 33591). Os *primers* utilizados são descritos na **Tabela 6**. A purificação do produto amplificado e o sequenciamento seguiram o mesmo protocolo da técnica de MLST, citado anteriormente, modificando somente os *primers* específicos.

A análise das sequências foi realizada pelo software *BioNumerics* (versão 7.6;

*Applied Maths*, Bélgica) que sincroniza os dados com *SeqNet/Ridom Spa Server* (Ridom *StaphType*, Ridom GmbH, Wurzburg, Alemanha).

**Tabela 6.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene *spa*

| <i>Primer</i> | <i>Sequência de nucleotídeos</i> |
|---------------|----------------------------------|
| Spa 1         | AGACGATCCTTCGGTGAGC              |
| Spa 2         | GCTTTTGCAATGTCATTACTG            |

### **Georreferenciamento**

Durante as visitas domiciliares, os sujeitos foram questionados se concordavam com o georreferenciamento dos domicílios através da aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) complementar. Nos casos em que houve consentimento, o posicionamento geográfico dos domicílios foi aferido por aparelho de Sistema de Posicionamento Global (GPS), dispositivo Montana 650 (Garmin, Olathe, KS, USA).

Para evitar identificação do local exato de residência, utilizamos protocolo de distorção aleatória. Os resultados foram analisados utilizando os *softwares* Map Info (© MapInfo Corporation North Greensburg, NY, USA) e ArcGIS (©ESRI, San Diego, CA, USA) para identificação de relações espaciais entre clones específicos de *S. aureus*.

As análises referentes ao georreferenciamento foram realizadas no Departamento de Higiene Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ).

#### 4. Referências

1. Fonseca MG, Bastos FI. Twenty-five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. *Cad Saúde Pública*. 2007;23.
2. Grangeiro A, Escuder MM, Castilho EA. Magnitude and trend of the AIDS Epidemic in Brazilian cities, from 2002 to 2006. *Rev. Saúde Pública*. 2010, 44:430-40.
3. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. 2015. Brasília.
4. UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*). Resumo informativo HIV/AIDS. 2017.
5. Greco DB, Simão M. Brazilian policy of universal access to AIDS treatment: sustainability challenges and perspectives. *AIDS*. 2007;21(4):37-45.
6. Okado JB, Bogni SC, Reinato LAF, Martinez R, Gir E, Camargo ILBC. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* dissemination among healthcare professionals and/or HIV patients from a tertiary hospital. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):51-6.
7. Hidron AL, Kempker R, Moanna A, Rimland D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. *Infect Drug Resist*. 2010, 3:73–86.
8. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009;23(1):17–34.
9. Kuritzkes DR. Neutropenia, Neutrophil Dysfunction, and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease: The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Clin Infect Dis*. 2000, 30(2):256-70.
10. Nguyen MH, Kauffman CA, Goodman RP, Squier C, Arbeit RD, Singh N, Wagener MM e Yu VL. Nasal Carriage of and Infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-Infected Patients. *Ann Intern Med*. 1999;130(3):221-5.
11. Shadyab AH, Crum-Cianflone NF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections among HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy: a review of the literature. *HIV Med*. 2012;13:319-32.
12. McDonald LC, Lauderdale TL, Lo HJ, Tsai JJ, Hung CC. Colonization of HIV-infected outpatients in Taiwan with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Int J STD AIDS*. 2003, 14(7):473-7.
13. Imaz A, Pujol M, Barragán P, Domínguez MA, Tiraboschi JM, Podzamczar D. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. *AIDS Rev*. 2010; 12(3):153-63.
14. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5:751–62.

15. Otto, M. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Annu. Rev. Microbiol. 2010;64:143–62.
16. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J. Bras. Patol. Med. 2007;43(6):413-423.
17. Partida AH, Espunes TS, Martínez JB. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community. J. Clin. Microbiol. 2010, 48(5):1701-5.
18. Reinato LAF, Pio DPM, Lopes LP, Pereira FMV, Lopes AER, Gir E. Colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em indivíduos com HIV/Aids atendidos em um hospital-escola brasileiro. Latino-Am. Enfermagem. 2013;21(6):1235-9.
19. Padoveze MC, Tresoldi AT, Nowakonski AV, Aoki FH, Branchini ALM. Nasal MRSA Colonization of AIDS Patients Cared for in a Brazilian University Hospital. ICHE. 2001, 22(12): 783-5.
20. Crum-Cianflone N, Weekes J, Bavaro M. Recurrent Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections among HIV-Infected Persons: Incidence and Risk Factors. AIDS Patient Care STDS. 2009; 23(7):499-502
21. Siberry GK, Frederick T, Emmanuel P, Paul ME, Bohannon B, Wheeling T et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children and Adolescents. AIDS Res Treat. 2012:1-7.
22. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. J Pathog. 2011:1-13.
23. Brown ML, O'Hara P, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA et al. Prevalence and sequence variation of Pantón-Valentine Leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States. J Clin Microbiol. 2012;50(1):86-90.
24. Szczuka E, Urbńska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Folia Microbiol. 2013; 1:1-6.
25. Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, Tian Y, Hu J, Yu F, Lu Y, Otto M. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. Nature Medicine. 2012, 18(5):816-20.
26. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Disponível em [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html). 2013

27. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M et al. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE. 2011;6(4):1793-6.
28. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. J Clin Microbiol. 2003; 41(11):5113-20
29. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 1999;37(11):3556-63
30. 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(3):1008-15.
31. Hallin M, Deplano A, Denis O, Mendonça R, Ryck R e Struelens MJ. Validation of *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* and *spa Typing* for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. J Clin Microbiol. 2007;45(1):127–33.
32. Hara FP, Suaya JA, Ray GT, Baxter R, Brown ML, Mera RM, Close NM, Thomas E e Amrine-Madsen H. *Spa typing* and multilocus sequence typing show comparable performance in a macroepidemiologic study of *Staphylococcus aureus* in the United States. Microb Drug Resist. 2016; 22(1): 88–96.
33. Konemann EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
34. Cunha MLS, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(8):855-60.
35. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3332-8.
36. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1998; 36(3): 618–23.
37. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement (M100-S22), 2012.
38. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement (M100-

S25), 2015.

39. 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(10):2240-4.
40. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(7):2155-61.
41. 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(9):3374-7.
42. Marconi C, Cunha MLRS, Araújo 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(2):117-128.
43. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RA, Araújo JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz J Micr.* 2006; 37: 64-69.
44. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):426-30.
45. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Pantón-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):594-600.
46. Koning S, van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen J, et al. Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Pantón-Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid pSK41. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3017-21.
47. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2151-6.



## 5. Apresentação da tese

Os resultados e a discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de artigos científicos.

5.1 **Artigo Científico I:** Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes vivendo com HIV/aids e seus contactantes domiciliares.

5.2 **Artigo Científico II:** Georreferenciamento e perfil de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à metilicina provenientes de pacientes vivendo com HIV/aids e seus contactantes domiciliares.

## 5.1 Artigo Científico I

### EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE PACIENTES VIVENDO COM HIV/AIDS E SEUS CONTACTANTES DOMICILIARES

Camila Sena Martins de Souza<sup>1,2</sup>, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza<sup>1</sup>, Letícia Chamma Lastoria<sup>1</sup>, Cassiano Victória<sup>3</sup>, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

<sup>3</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

#### Resumo

**Introdução:** *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) são os principais responsáveis por infecções tanto adquiridas na comunidade quanto em ambiente de assistência à saúde destacando-se por sua patogenicidade e alta frequência, permitindo que este agente seja capaz de produzir doenças tanto em indivíduos sadios quanto em imunocomprometidos por sua fácil disseminação. Esse fato é agravado pela ampla disseminação de isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). **Objetivos:** Trata-se de um estudo transversal, cujos objetivos foram determinar a relação clonal de MRSA e MSSA entre isolados provenientes de 368 pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA), (112 residentes na cidade de Botucatu e 256 na região), e 73 contactantes domiciliares dos pacientes da cidade de Botucatu, bem como realizar o georreferenciamento dos domicílios, a fim de conhecer o comportamento de *S. aureus* em uma população de risco especial e em seu núcleo familiar. **Metodologia:** PCR foi utilizado para detecção do gene *mecA* e para tipagem do SCC*mec*. Para a tipagem molecular foi utilizado a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, *Multilocus Sequence Typing* e *spa Typing*. Além disso, foi

realizado o georreferenciamento dos domicílios no momento da coleta. **Resultados:** Apontam para uma baixa taxa de colonização nessas PVHA (26%). Os métodos de tipagem revelaram similaridades entre os isolados de PVHA e contactantes domiciliares e também com isolados provenientes de estudos anteriores realizados na cidade de Botucatu com pessoas saudáveis. **Conclusão:** Neste estudo observamos a presença de isolados agrupados com importantes clones internacionais. Além disso, foi possível observar a distribuição desses isolados por toda a cidade de Botucatu e a presença do clone ST398.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, Pessoa vivendo com HIV/aids (PVHA), *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

## Introdução

Estima-se que 36,7 milhões de pessoas em todo o mundo viviam com HIV em 2016, sendo que 1,8 milhão foram novas infecções pelo HIV ocorridas no ano de 2016. Além disso, 1 milhão de pessoas morreram em 2016 por causas relacionadas à aids.<sup>1</sup>

O sucesso do programa brasileiro de controle do HIV/aids é reconhecido mundialmente devido à sua abordagem que inclui a prevenção e o acesso universal e gratuito das drogas antirretrovirais.<sup>2</sup>

As PVHA apresentam diversos fatores associados à maior risco de carreamento de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), como comportamentos sexuais de alto risco, uso de drogas, imunossupressão, exposição ao ambiente hospitalar e uso frequente de antimicrobianos, além de apresentarem maior tendência ao desenvolvimento de doença invasiva.<sup>3,4</sup>

A maioria dos casos de infecção hospitalar por *S. aureus* ocorre em carreadores nasais e o risco de infecção aumenta em três a 12 vezes em portadores de *S. aureus* na admissão em comparação com não portadores. Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contato.<sup>5,6</sup>

Considerando a relevância de *S. aureus* e MRSA e seu impacto sobre a saúde em PVHA, é necessário maior conhecimento da sua epidemiologia na população do Brasil.

Diante disso, o objetivo foi determinar a relação clonal de MRSA e MSSA, incluindo o georreferenciamento dos domicílios, a fim de conhecer o comportamento de *S. aureus* em uma população de risco especial e em seu núcleo familiar.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostragem**

Os isolados são provenientes da nasofaringe e orofaringe de 368 (112 residentes em Botucatu) pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) acima de 15 anos que estavam frequentando regularmente o Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAE/DAM) do complexo da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Fundação para o Desenvolvimento Médico Hospitalar (FAMESP) e concordaram em participar do estudo. A cidade de Botucatu possui aproximadamente 130.000 habitantes (22° 53' 09" S, 48° 26' 42" W) e é o único centro de referência da região compreendendo 500.000 pessoas.

Não houve critério de exclusão específico, no entanto, devido a restrições da legislação de ética não poderíamos incluir indivíduos privados de liberdade no estudo.

Além disso, foi realizada a busca de contactantes domiciliares de cada paciente da cidade de Botucatu. Resumidamente, uma visita domiciliar foi agendada após a inclusão no estudo. Durante a visita foi realizada a segunda coleta de *swab* nasal e da orofaringe do paciente, a coleta de 73 contactantes domiciliares que não estavam infectados pelo HIV e, por fim, o georreferenciamento dos domicílios.

A terceira coleta dos pacientes residentes na cidade de Botucatu foi realizada em retorno agendado para consultas médicas de rotina (em média, 3 meses após o primeiro levantamento).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Brasil (nº do parecer: 1.168.173).

### **Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus***

Os micro-organismos foram identificados como descrito por Konemann et al<sup>7</sup> e Cunha et al.<sup>8</sup> Após a extração do DNA com *Kit Illustra* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) foi realizada a confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* através da detecção do gene que codifica o RNAr 16S e do fragmento de DNA SA442, específico de *S. aureus*.<sup>9</sup>

### Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI*.<sup>10</sup> As drogas utilizadas foram: Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Linezolida (30µg), Quinupristina/Dalfopristina (15µg) e Sulfametoxazol/Trimetoprim (25µg). A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Vancomicina foi avaliada através do método de E-test.<sup>11</sup>

### Deteção do gene *mecA* de resistência à meticilina

A reação de PCR para a detecção do gene *mecA* foi realizada conforme os parâmetros descritos por Murakami et al.<sup>12</sup> A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada como descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>13</sup> e atualizado por Milheirinho et al.<sup>14</sup>

### Tipagem molecular dos isolados

Todos os isolados de *S. aureus* foram tipados através do *Pulsed-Field Gel Eletroforesis* (PFGE) utilizando o protocolo modificado de McDougal et al.<sup>15</sup> Nove isolados não puderam ser tipados utilizando a enzima *SmaI* e para estes casos foi utilizada a enzima de restrição *ApaI*.<sup>16</sup>

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; *Applied Maths*, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustadas para 1,0% e 1,2%, respectivamente. Foi considerado um *cluster* o agrupamento com quatro ou mais isolados. Dentro de cada *cluster* um isolado foi escolhido de forma aleatória para ser analisado pela técnica de MLST e *spa typing*.

*Multilocus sequence typing* (MLST) foi realizado como descrito por Enright et al.<sup>17</sup> e as análises dos resultados realizados de acordo com os dados do site oficial do MLST ([http:// saureus.mlst.net](http://saureus.mlst.net)).

Para a técnica de *spa typing* foi utilizado o protocolo descrito por Shopsin et al.<sup>18</sup> e as análises realizadas no software *BioNumerics* (versão 7.6; *Applied Maths*, Bélgica), através de *plugin* específico de acesso ao banco de dados do *Ridom Spa Server* (<http://www.spaserver.ridom.de>).

### **Georreferenciamento**

Durante as visitas domiciliares, nos casos em que houve consentimento favorável, o posicionamento geográfico dos domicílios foi aferido por aparelho GPS Garmin Montana 650, anotando-se a latitude e longitude. Para evitar identificação do local exato de residência, utilizamos protocolo de distorção aleatória. Os resultados foram analisados utilizando os *softwares* MapInfo (© MapInfo Corporation North Greensburg, NY, USA) e ArcGIS (©ESRI, San Diego, CA, USA) e sobreposto ao mapa na cidade de Botucatu e ao mapa do Estado de São Paulo para identificação de relações espaciais entre clones específicos de *S. aureus*.

### **Resultados**

A prevalência de colonização por *S. aureus* na primeira coleta foi de 26%. As taxas de carreamento nasal e de orofaringe foram de 20,9% e 8,4%, respectivamente. Na primeira coleta dez indivíduos eram colonizados com MRSA (8 nas narinas e 2 na orofaringe), a taxa de prevalência foi de 2,7%.

Apenas 67 indivíduos (59,8% dos que vivem em Botucatu) aceitaram ser acompanhados durante mais duas coletas com inclusão dos contactantes domiciliares. Na segunda coleta realizada no domicílio do paciente a prevalência de colonização por *S. aureus* entre as PVHA foi de 23,9%, com a presença de três isolados de MRSA (2 nas narinas e 1 na orofaringe). Já entre os contactantes domiciliares foi de 30%, com a identificação de quatro MRSA (2 nas narinas e 2 na orofaringe). E por fim, terceira e última coleta que ocorreu no retorno do paciente ao ambulatório, a prevalência encontrada foi de 25,3% com dois MRSA (1 na narina e 1 na orofaringe).

É importante ressaltar que a terceira coleta foi possível em apenas 63 pacientes e dentre esses 14 (22,2%) carreamos *S. aureus* em duas ou três coletas, ou seja, eram carreadores persistentes.

### **Determinação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos**

Em relação à oxacilina e cefoxitina, o método de disco-difusão revelou 14 amostras resistentes, das quais seis foram resistentes a ambas as drogas e oito apenas a cefoxitina. É importante ressaltar que cinco isolados se mostraram sensíveis em ambos os discos, mas foram positivos no teste genotípico.

Dentre todas as amostras, cinco apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, sendo quatro provenientes de pacientes com contagem de células TCD4+ inferior a 200 células/ mm<sup>3</sup> que fizeram uso do antimicrobiano de modo profilático para pneumocistose e toxoplasmose no ano anterior a coleta.

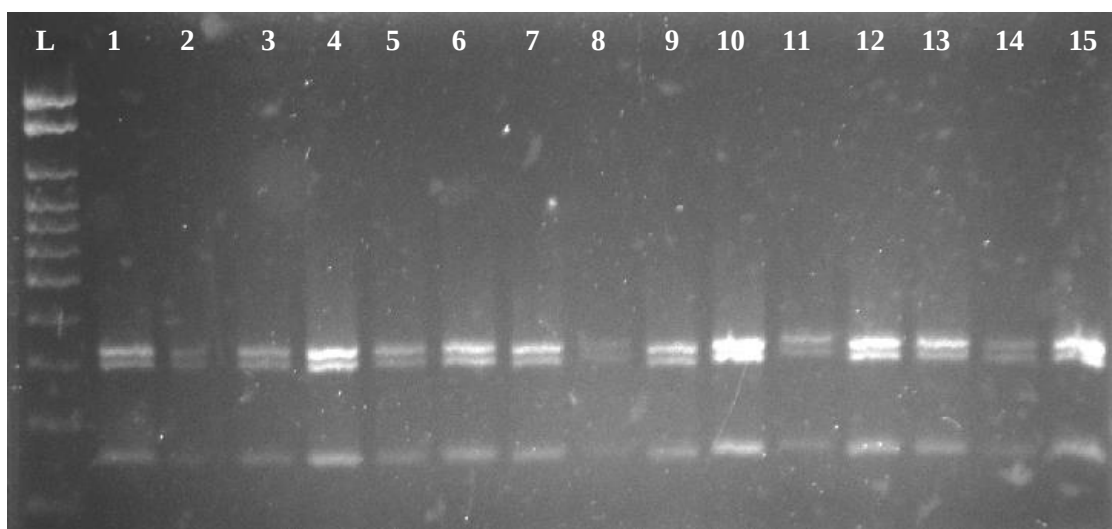
No entanto, não foram encontrados casos de resistência à quinupristina-dalfopristina e linezolida.

Além disso, o resultado encontrado para a CIM da vancomicina foi CIM<sub>50</sub> de 0,75µg/mL e CIM<sub>90</sub> 1,0µg/mL, com todos isolados sensíveis.

### **Deteção do gene *mecA* e caracterização do SCC*mec***

Do total de 178 isolados de *S. aureus*, 19 (10,6%) eram carreadores do gene *mecA*, dentre esses quatro eram provenientes de contactantes domiciliares. Dos 19 MRSA, apenas 5(26,3%) foram isoladas de PVHA que relataram internação no ano anterior a coleta.

Como demonstrado na **Figura 1**, houve uma prevalência do SCC*mec* Tipo IV entre os isolados, porém, quatro não foram possíveis de serem tipados pela técnica utilizada.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com Sybr® Safe) evidenciando os produtos amplificados do SCC*mec* Tipo IV nos isolados de MRSA.

### ***Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE***

Foi realizado um dendrograma de isolados MRSA e juntamente com estes foram adicionados os MRSA provenientes de um estudo populacional realizado anteriormente

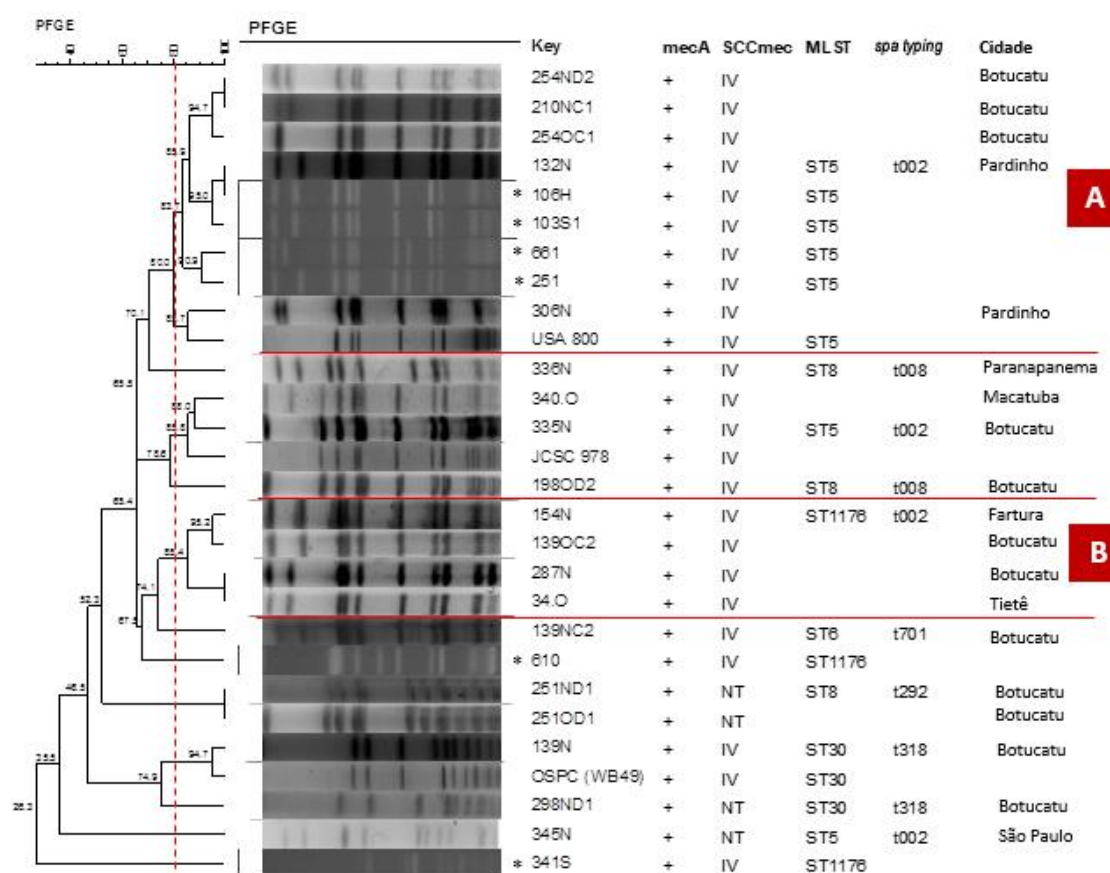
na cidade de Botucatu.<sup>19</sup> A análise permitiu identificar a presença de dois *clusters* majoritários (A e B) com similaridade  $\geq 80\%$  (**Figura 2**).

Entre os MRSA, no *cluster* A é possível verificar que quatro dos seis isolados do estudo realizado anteriormente agruparam-se com alguns isolados das PVHA, sendo importante ressaltar que houve um caso de 100% de similaridade (132N e 106H), o que demonstra a presença de isolados similares entre indivíduos saudáveis e PVHA na cidade e na região de Botucatu.

Além disso, é interessante ressaltar que os dois únicos isolados resistentes da cidade de Pardinho (132N e 306N) agruparam no mesmo *cluster* demonstrando uma alta similaridade entre eles.

Já no *cluster* B temos a presença de isolados provenientes de diferentes pacientes, demonstrando uma alta similaridade entre eles. Além disso, também verificamos a presença de um isolado (139N) agrupando com o Clone Oceania Sudoeste do Pacífico (OSPC) indicando a circulação deste clone que já foi relacionado a infecções de pele na comunidade.





\* Isolados provenientes de estudo realizado anteriormente com a população de Botucatu<sup>19</sup>

Key: nº de identificação do paciente; N=nasal; O=oral; D1=2ª coleta do paciente (domicílio); C2=contactante nº2; D2=3ª coleta do paciente (retorno no ambulatório); NT= Não tipado

**Figura 2.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de MRSA provenientes de PVHA e seus contactantes domiciliares.

Entre os isolados sensíveis foi possível observar a presença de 10 *clusters* majoritários (**Anexo II**) nomeados de A-J, em que no *cluster* A, é possível observar a presença de três isolados provenientes do mesmo paciente identificado como 185, ressaltando que durante todo o período de estudo o paciente carregava isolados com o mesmo perfil.

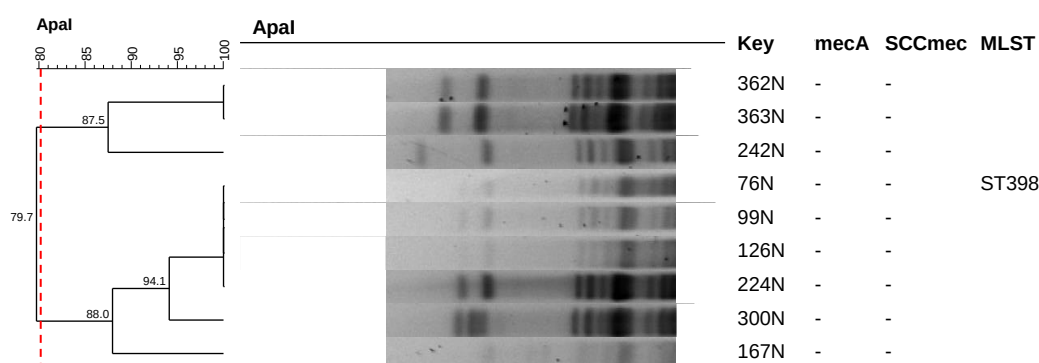
No *cluster* B, dois isolados se mostraram idênticos (25ND1 e 25OD1) revelando que o paciente carregava isolado com o mesmo perfil tanto nas narinas como na orofaringe. Já no *cluster* C é importante ressaltar a similaridade de 100% apresentada por isolado proveniente de paciente e contactante domiciliar (18ND1 e 18NC2) no momento da coleta domiciliar, demonstrando a possível transmissão no ambiente familiar.

Outros isolados semelhantes podem ser observados no *cluster* G, no qual isolado proveniente da PVHA se revelou idêntico ao seu contactante domiciliar (107N e 107NC1), além de demonstrar que o contactante domiciliar possuía o mesmo isolado em ambos sítios de coleta.

Dentre os *clusters* de MSSA, dois (C e G) se destacaram por concentrar maior número de isolados com similaridade acima de 80%, revelando a presença de isolados semelhantes em diferentes cidades da região de Botucatu.

Entre os isolados MSSA alguns não puderam ser tipados pela técnica de PFGE utilizando a enzima de restrição *SmaI*, no entanto, a tipagem foi realizada utilizando a enzima *ApaI*, demonstrando a presença de um único *cluster* agrupando todas as 9 amostras de pacientes diferentes com 79,7% de similaridade (**Figura 3**).

Estes casos demonstram a relevância do estudo desses isolados, uma vez que dentre aqueles pertencentes ao *cluster* majoritário foi encontrado um isolado ST398. Este clone é de grande importância, já que está associado à disseminação entre seres humanos e animais.



Key: nº de identificação do paciente; N=nasal

**Figura 3.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de isolados que sofreram digestão pela enzima *ApaI*.

### Multilocus Sequence Typing – MLST

Após a triagem pela técnica de PFGE os clones foram caracterizados através da técnica de MLST que consiste na amplificação dos sete genes *housekeeping* e foi possível observar que os *sequence types* (STs) foram distintos e nem todos pertenciam ao mesmo complexo clonal (CC) revelando diferentes origens.

É importante ressaltar que foi selecionado aleatoriamente um MSSA (76N) dentre os isolados do dendrograma realizado com a enzima de restrição *ApaI*. Este foi caracterizado como uma importante linhagem clonal denominada ST398.

### *spa typing*

Após a análise pelo MLST os isolados foram submetidos à técnica de *spa typing* demonstrando *spa types* distintos. Na **Tabela 1** é possível observar a prevalência do SCCmec Tipo IV entre os isolados.

**Tabela 1.** Características dos isolados tipados pelas técnicas de MLST e *spa typing*

| Amostra | <i>mecA</i> | SCCmec | MLST | <i>spa type</i> |
|---------|-------------|--------|------|-----------------|
| 132N    | +           | IV     | 5    | t002            |
| 139N    | +           | IV     | 30   | t318            |
| 154N    | +           | IV     | 5    | t002            |
| 335N    | +           | IV     | 5    | t002            |
| 336N    | +           | IV     | 8    | t008            |
| 345N    | +           | NT     | 5    | t002            |
| 139NC2  | +           | IV     | 6    | t701            |
| 251ND1  | +           | NT     | 8    | t292            |
| 298ND1  | +           | NT     | 30   | t318            |
| 198OD2  | +           | IV     | 8    | t008            |
| 76N     | -           | -      | 398  | -               |

Amostra: nº de identificação do paciente/ N=nasal/O=oral/C2=contactante nº2/D1=2ª coleta (domicílio)/D2=3ª coleta (retorno no ambulatório); NT: Não tipado

### Georreferenciamento

Foi realizado o georreferenciamento dos domicílios onde residem as PVHA da área urbana de Botucatu incluídas no estudo. Para efeitos desta análise, levou-se em conta a positividade para *S. aureus* ou MRSA entre os pacientes residentes na cidade de Botucatu (**Figura 4**). Além disso, foram realizados mapas a fim de observar áreas de maior densidade de isolados *S. aureus* e MRSA na cidade de Botucatu (**Figura 5**).

Nos mapas de densidade observamos que no primeiro mapa a região A (Jardim Paraíso) apesar da baixa densidade de *S. aureus* apresentou a segunda maior densidade de MRSA na cidade, já na região B (Vila São Lúcio) apesar da alta densidade de isolados *S. aureus*, apresentou isolados MRSA com menos intensidade que outras regiões.

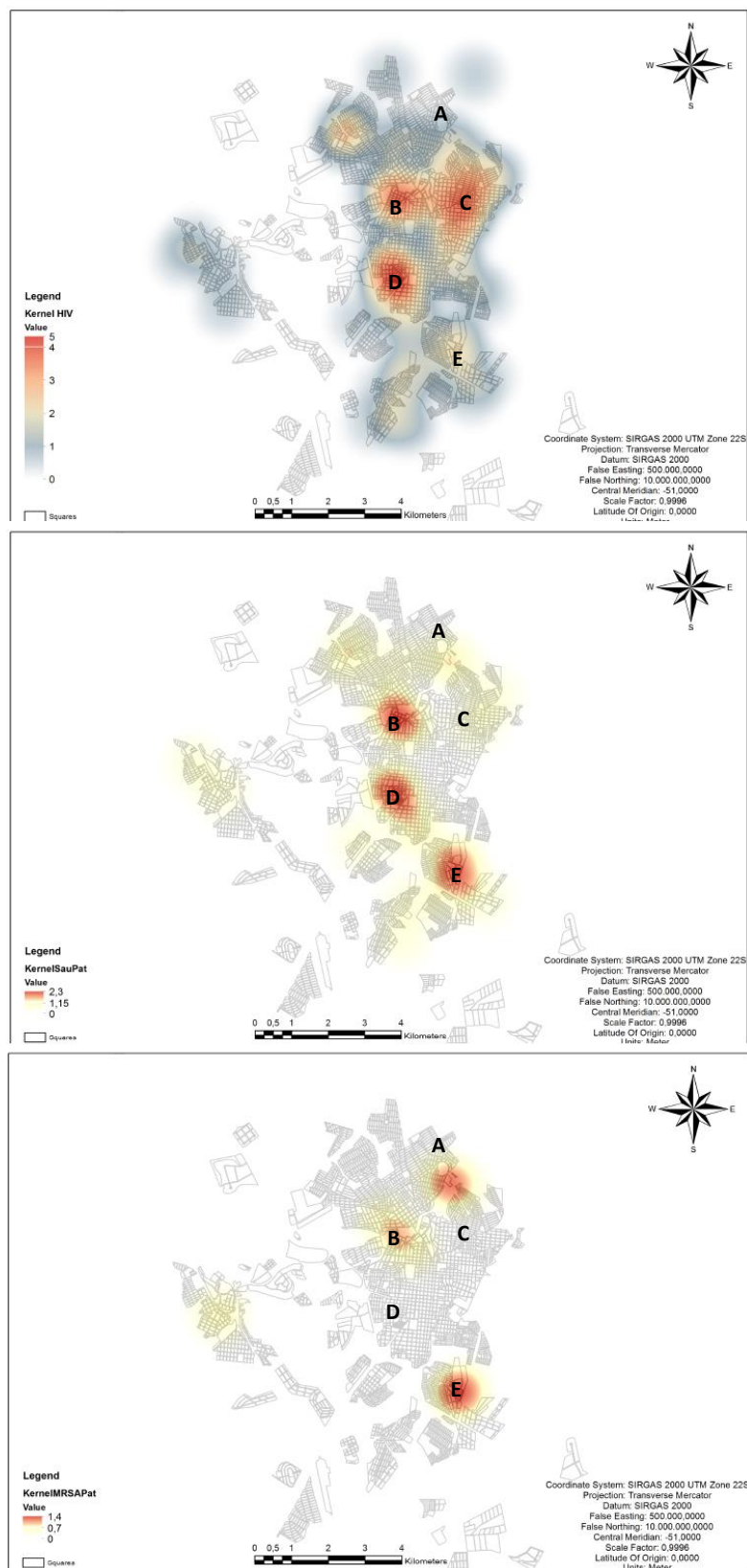
A região C (Jardim Ipyranga, Jardim Peabiru e Residencial Arlindo Durante) apresentou alta densidade de pacientes participantes do estudo, no entanto não houve uma alta densidade em relação à presença de *S. aureus* e nenhum MRSA representado no segundo e terceiro mapas. Porém, quando observamos a região D (Vila Santa Luzia) houve alta densidade de *S. aureus* com ausência de isolados MRSA.

Por fim, na região E (Chácara Recreio do Havaí) apesar da baixa prevalência de pacientes, houve alta densidade de MRSA. A análise demonstra que a prevalência de MRSA independe da densidade de isolados de *S. aureus*.

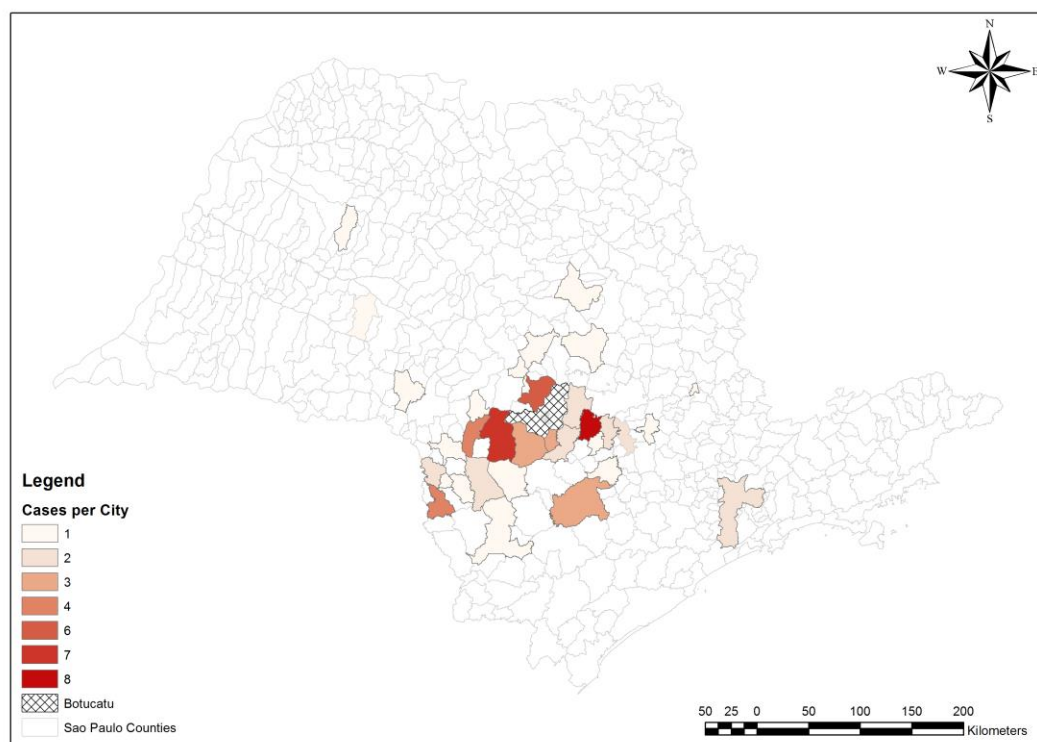
Na **Figura 6** são apresentados os casos positivos para *S. aureus* de acordo com as cidades da região de Botucatu, onde as cidades com a presença de mais *clusters* devem-se ao maior número de pacientes participantes do estudo. Além disso, foi realizada uma análise de PFGE com todos os isolados do estudo, MRSA e MSSA, para observar a similaridade entre os isolados das cidades da região. Através dessa análise é possível observar as cidades que compartilham isolados semelhantes, ou seja, pertencentes ao mesmo *cluster*. Como exemplo, podemos citar a cidade de Iaras e Anhembi ambas representadas com a cor marrom no mapa que compartilham isolados no mesmo *cluster* com a denominação H (**Figura 7**).



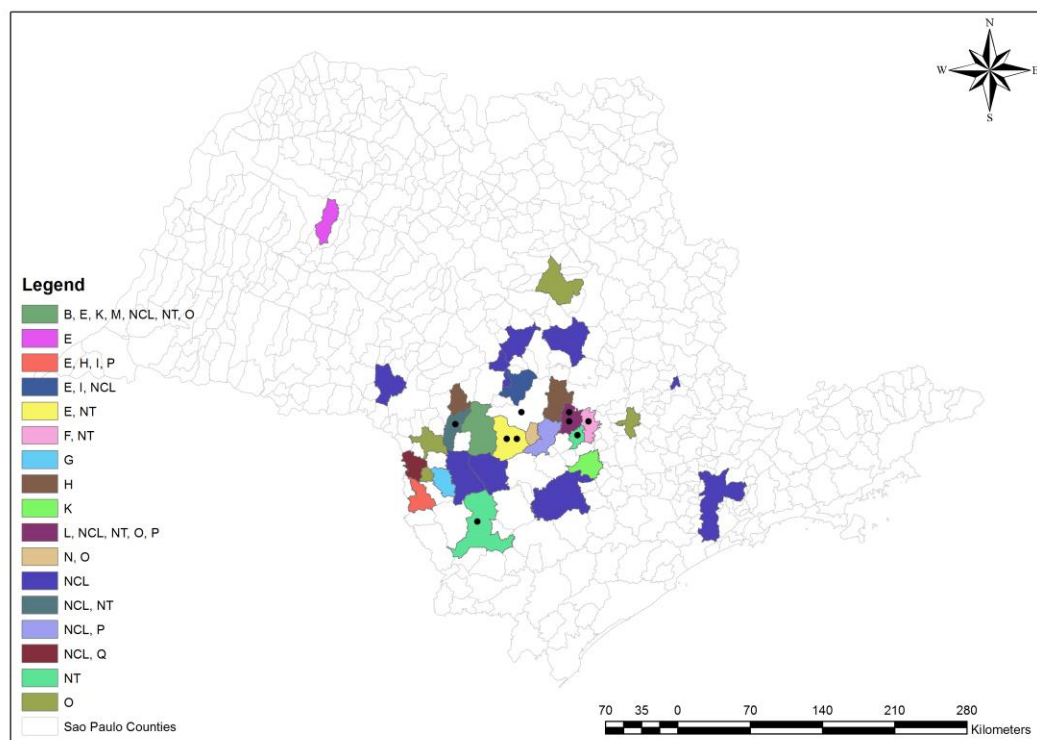
**Figura 4.** Os endereços dos indivíduos foram sobrepostos a um mapa da área urbana de Botucatu, São Paulo. O mapa A apresenta a localização das residências dos pacientes colonizados com *S. aureus* (vermelha) e os pacientes negativos (verde). No mapa B, são representados os pacientes que carregavam MRSA (amarelo) e aqueles que não carregavam MRSA (azul).



**Figura 5.** Mapas Kernel de densidade da distribuição espacial de todos os pacientes residentes na cidade de Botucatu, seguido do mapa que representa aqueles colonizados com *S. aureus* e por fim o mapa representando os isolados MRSA.



**Figura 6.** Mapa da distribuição dos casos positivos por cidades da região de Botucatu



NT: Não tipado/NCL: Nenhum *cluster*/● Isolados tipados com *Apal*

**Figura 7.** Mapa da distribuição dos *clusters* obtidos na tipagem por PFGE realizado com todos os isolados de *S. aureus* do estudo em relação às cidades do estado de São Paulo.

## Discussão

Estudos têm demonstrado que *S. aureus* tem sido uma importante causa de morbidade entre pacientes hospitalizados e tem identificado que PVHA têm um risco aumentado para colonização por micro-organismos patogênicos, principalmente quando relacionado ao *S. aureus* e consequentemente a ocorrência de infecções, incluindo bacteremias, endocardites e infecções de pele.<sup>20,21</sup>

No entanto, o presente estudo apresentou baixa taxa de colonização (26%) por *S. aureus* em PVHA mesmo realizando a coleta em dois sítios distintos, mas corrobora com os resultados encontrados por Reinato e colaboradores<sup>4</sup>, quando avaliaram a prevalência da colonização nasal por *S. aureus* em PVHA internadas em um hospital-escola do Estado de São Paulo, onde entre 169 pacientes, 27,2% (46) carregavam *S. aureus* no momento da coleta. Por outro lado, Padoveze e colaboradores<sup>22</sup> realizaram três coletas em 111 PVHA e encontraram 63,1% com pelo menos uma cultura positiva para *S. aureus*.

Dentre os isolados a prevalência foi maior nas narinas (20,9%), embora, exista a possibilidade de indivíduos serem colonizados exclusivamente na orofaringe e estes seriam negligenciados em estudos de portadores com coletas limitadas às narinas.<sup>23</sup>

Resultados semelhantes foram relatados em estudo recente realizado por Crum-Cianflone e colaboradores<sup>24</sup> que analisaram *swabs* provenientes de diferentes sítios do paciente infectado com HIV e encontraram prevalência maior nas narinas (33%) quando comparado à orofaringe (5%).

É possível observar uma taxa de prevalência maior entre os contactantes domiciliares quando comparados aos pacientes e como prováveis fatores de proteção contra a colonização por *S. aureus* entre as PVHA, incluem-se o uso de antirretroviral e o uso profilático de sulfametoxazol+trimetoprima para pneumocistose e toxoplasmose cerebral em pacientes com contagem de células TCD4+ inferior a 200 células/ mm.<sup>25</sup> O sulfametoxazol+trimetoprima é um antibacteriano de largo espectro que pode ter impacto sobre a colonização por *S. aureus* na PVHA, principalmente em uso em longo prazo.<sup>4,25,26</sup>

Estudos realizados relatam que o uso da terapia antirretroviral foi associado a diminuição do risco de colonização por MRSA e o uso de sulfametoxazol-trimetoprima tem efeito de proteção.<sup>27,28</sup> Apesar disso, o sulfametoxazol-trimetoprim ainda é o



antimicrobiano mais utilizado para tratar infecções de pele e tecidos moles por MRSA em PVHA.<sup>29</sup>

Apesar da taxa de prevalência de MRSA encontrada ser considerada baixa, mostrou-se superior a uma recente meta-análise que relatou taxas de prevalência de 6,9% de PVHA carreando MRSA.<sup>30</sup> Uma pesquisa realizada incluindo pacientes ambulatoriais HIV-positivos do interior de São Paulo não encontrou qualquer isolado MRSA.<sup>22</sup>

O estudo apresentou somente SCCmec Tipo IV entre os isolados tipados concordando com Cenizal e colaboradores<sup>28</sup> que também encontraram alta prevalência, sendo que 12 dos 15 isolados carreavam SCCmec Tipo IV em PVHA de um ambulatório. Além disso, Skiest e colaboradores<sup>31</sup> realizaram estudo com PVHA que apresentavam infecção de pele e constaram que 21 dos 24 isolados carreavam o SCCmec Tipo IV.

Quanto à clonalidade, entre os MRSA observamos disseminação na cidade de Botucatu demonstrado pela similaridade entre isolados provenientes de pessoas saudáveis e PVHA.

Além disso, é importante ressaltar que o isolado 139N apresentou alta similaridade (94,1%) com o OSPC utilizado como controle, em que ambos carregam o SCCmec Tipo IV e possuem o ST30 demonstrando sua provável origem comum.

Entre os isolados MSSA destaca-se a presença de *clusters* com diversos isolados o que demonstra a similaridade entre isolados de diferentes cidades.

Um grande cluster de MSSA mostrou similaridade com uma importante linhagem clonal denominada ST398. Uma peculiaridade das linhagens de ST398 é que não são digeridas pela enzima de restrição *Sma*I gerando bandas muito fracas, degradadas ou simplesmente não gerando bandas e com isso não são interpretáveis pelo PFGE. Este é o resultado de um sistema de restrição/metilação do DNA ainda desconhecido no gênero *Staphylococcus* spp. No entanto, demonstramos a possibilidade de realizar a digestão com a enzima *Apa*I.<sup>32,33</sup>

Entre os isolados MRSA é possível observar a presença de 3 isolados (132N, 335N e 345N) identificados como ST5-t002. O fato desse clone ter sido identificado em cidades com características distintas (Pardinho, Botucatu e São Paulo) sugere ampla disseminação do clone no Estado de São Paulo.

Um dos contactantes domiciliares (139NC2) carregava um isolado caracterizado como ST6-t701. Estudos realizados por Yan e colaboradores<sup>34</sup> também encontraram ST6- t701 provenientes de isolados associados à infecção alimentar na China.

Além disso, Li e colaboradores<sup>35</sup> analisaram isolados provenientes de surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus* e encontraram como clones predominantes o ST6-t701 seguido do ST5-t002, ambos também encontrados em nosso estudo.

Um dos pacientes (154N) carregava isolado caracterizado como ST1176, este foi descrito pela primeira vez por Carmo e colaboradores<sup>36</sup> em isolados de pacientes do Hospital São Paulo e posteriormente em pacientes de ambulatório de Dermatologia,<sup>37</sup> indivíduos saudáveis da cidade de Botucatu<sup>19</sup> e pacientes com feridas.<sup>38</sup>

Também observamos a presença de isolados ST8-t008, assim como Sola e colaboradores<sup>39</sup> que relataram a presença de isolados ST8-t008 carregando SCCmec IV em crianças na Argentina.

As cepas ST30, SCCmec Tipo IV com o gene *pvl* foram isoladas pela primeira vez em ilhas do Pacífico. Além disso, é o clone prevalente entre pacientes com infecção de pele em Hong Kong. Diep e Otto<sup>40</sup> apresentaram as cinco cepas de MRSA responsáveis pela maioria das doenças em todo o mundo, estando em segundo lugar a linhagem clonal ST30 (OSPC), que foi apontada como responsável por surtos comunitários na Austrália, Grécia, México e Estados Unidos.

Além disso, a linhagem ST30 já foi relatada em outras cidades brasileiras como Rio de Janeiro e Porto Alegre demonstrando seu potencial de disseminação.<sup>41</sup>

A linhagem ST398 tem sido isolada em seres humanos e animais de companhia, como cão, cavalo e porco na Alemanha e na Áustria.<sup>33</sup> Foi identificado em suínos holandeses e em suinocultores. O MSSA com ST398 circula entre seres humanos em baixa frequência (0,2%), apesar disso tem potencial para causar infecções em humanos. Acredita-se que o contato próximo entre alimentos de origem animal e seres humanos aumenta o risco de transferência para o ser humano.<sup>42</sup>

Welinder-Olsson e colaboradores<sup>43</sup> relatam que os pacientes do estudo apresentaram infecções e necessitaram de assistência médica. Um fato interessante é que nenhum dos pacientes apresentava contato com animais e nenhuma fonte comum de infecção. Segundo os autores os relatos sugerem que esta linhagem pode impor uma ameaça para a comunidade e até mesmo para aqueles sem contato com animais.

Encontramos *S. aureus* isolados dos pacientes bem distribuídos em toda a cidade de Botucatu, no entanto, os isolados MRSA não foram encontrados na região central da cidade.

Em relação ao georreferenciamento, observamos uma distribuição de *S. aureus* em toda a cidade de Botucatu, porém, a prevalência maior de MRSA encontra-se na região norte da cidade.

Nos mapas de densidade foi possível observar que a cidade de Botucatu possui características diferentes de acordo com a região da cidade, demonstrando que a ocorrência de MRSA não é necessariamente maior nos locais que apresentam densidade maior de *S. aureus*.

Os mapas revelaram casos importantes como da região E onde haviam poucos isolados de *S. aureus*, no entanto, dentre esses uma alta densidade de isolados MRSA.

É importante relatar que as cidades Conchas e Avaré foram as que mais se destacaram na relação casos por cidade, no entanto, isso ocorreu por serem as cidades com mais pacientes participantes do estudo. Outro fato que merece destaque é que dos 13 PVHA da cidade de Pardinho, três estavam colonizados com *S. aureus* e dois destes com MRSA pertencentes ao mesmo *cluster*.

Um fato interessante observado no mapa da distribuição dos clones na região de Botucatu foi que dentre os nove isolados tipados com a enzima de restrição *ApaI* (ST398) quatro destes eram provenientes de cidades vizinhas (Conchas, Pereiras e Laranjal Paulista), demonstrando possível disseminação desses isolados no interior do Estado de São Paulo.

## **Conclusão**

Foram encontrados isolados que agruparam com importantes clones internacionais como OSPC e USA 800, o que demonstra sua circulação entre PVHA na cidade e na região de Botucatu. Outro fato relevante é que apenas pacientes carregavam isolados com similaridade ao ST398, o que pode sugerir que tenha sido adquirido no ambiente hospitalar. Foi demonstrado que a ocorrência de MRSA não é necessariamente maior nos locais que apresentam densidade maior de *S. aureus*.

## Referências

1. UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*). Resumo informativo HIV/AIDS. 2017.
2. Greco DB, Simão M. Brazilian policy of universal access to AIDS treatment: sustainability challenges and perspectives. *AIDS*. 2007;21(4):37-45.
3. Shadyab AH, Crum-Cianflone NF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections among HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy: a review of the literature. *HIV Med*. 2012;13:319-32.
4. Reinato LAF, Pio DPM, Lopes LP, Pereira FMV, Lopes AER, Gir E. Colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em indivíduos com HIV/Aids atendidos em um hospital-escola brasileiro. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2013;21(6):1235-9.
5. Simor AE. Staphylococcal decolonisation: an effective strategy for prevention of infection? *Lancet Infect Dis* 2011;11:952-62.
6. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med*. 2007;43(6):413-423.
7. Konemann EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
8. Cunha MLS, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(8):855-60.
9. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(3):618-23.
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, tenth edition (M02-A10). Wayne, PA: CLSI. 76 p, 2009.
11. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement (M100-S25), 2015.
12. 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(10):2240-4.
13. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2155-61.

14. 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(9):3374-7.
15. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5113-20.
16. Rasschaert G, Vanderhaeghen W, Dewaele I, Janez N, Huijsdens X, Butaye P, Heyndrickx M. Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. J Clin Microbiol. 2009;3313-22.
17. 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(3):1008-15.
18. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 1999;37(11):3556-63.
19. Pires FV, Cunha MLRS, Abraão LM, Martins PYF, Camargo CH, Fortaleza CMCB. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A population-based survey. 2014;9(3):1-7
20. McDonald LC, Lauderdale TL, Lo HJ, Tsai JJ, Hung CC. Colonization of HIV-infected outpatients in Taiwan with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Int J STD AIDS. 2003, 14(7):473-7.
21. Imaz A, Pujol M, Barragán P, Domínguez MA, Tiraboschi JM, Podzamczar D. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. AIDS Rev. 2010; 12(3):153-63.
22. Padoveze MC, Pedro RJ, Blum-Menezes D, Bratfich OJ, Moretti ML. *Staphylococcus aureus* nasal colonization in HIV outpatients: Persistent or transient? AJIC. 2008, 36(3): 187-91.
23. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. J. Clin. Microbiol., 2010, 48(5):1701.
24. Crum-Cianflone NF, Shadyab AH, Weintrob A, Hospenthal DR, Lalani T, Collins G, Mask A, Mende K, Brodine SK, Agan BK. Association of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization with high-risk sexual behaviors in persons infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). Medicine. 2011;90(6):379-89.
25. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2017.

26. Kraef C, Alabi AS, Peters G, Becker K, Kremsner PG, Rossatanga EG, Mellmann A, Grobusch MP, Schaumburg F. Co-detection of Panton-valentine Leukocidin encoding genes and cotrimoxazole resistance in *Staphylococcus aureus* in Gabon: implications for HIV-patients' care. *Front Microbiol.* 2015; 6(1):1-7.
27. Ramsetty SK, Stuart LL, Blake RT, Parsons CH, Salgado CD. Risks for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization or infection among patients with HIV infection. *HIV Medicine.* 2010;11:389-94.
28. Cenizal MJ, Hardy RD, Anderson M, Katz K, Skiest DJ. Prevalence of and Risk Factors for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Nasal Colonization in HIV-Infected Ambulatory Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(5):567-71.
29. Michalek K, Lechowicz M, Pastuszczyk M, Wojas-Pelc A. The use of trimethoprim and sulfamethoxazole (TMP-SMX) in dermatology. *Folia Medica Cracoviensia.* 2015;55(1):35-41.
30. Zervou FN, Zacharioudakis IM, Ziakas PD, Rich JD, Mylonakis. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in HIV infection: a meta-analysis. *CID.* 2014;59(1):1302-11.
31. Skiest D, Brown K, Hester J, Moore T, Crosby C, Mussa HR, Hoffman-Roberts H, Cooper T. Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an urban HIV clinic. *HIV Medicine.* 2006;7:361-8.
32. Bens CCPM, Voss A, Klaassen CHW. presence of a novel dna methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1875-6.
33. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(2):255-8.
34. Yan, Xiaomei, Wang B, Tao X, Hu Q, Cui Z, Zhang J, Lin Y, You Y, Shi X, Grundmann H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning in Shenzhen, China. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(18):6637-42.
35. Li G, Wu S, Luo W, Su Y, Luan Y, Wang X. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006-2013) in Xi'an, China. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12(3):203-6.
36. Carmo MS, Inoue F, Andrade SS, Paschoal L, Silva FM, Oliveira FGS et al. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol.* 2011;44(10):1013-7.

37. Souza CSM. *Staphylococcus aureus*: Resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência e tipagem de MRSA pelas técnicas de MLST e *spa typing* [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2014.
38. Franchi EPLP. Epidemiologia molecular e estudo dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2016.
39. Sola C, Paganini H, egea AL, Moyano AJ, Gamero A, Kevric I, Culasso C, Vindel A, Lopardo H, Bocco JL. Spread of Epidemic MRSA-ST5-IV Clone Encoding PVL as a Major Cause of Community Onset Staphylococcal Infections in Argentinean Children. *Plos One*. 2012;7(1):1-12.
40. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends microbial*. 2008;16(8):361-369.
41. Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, Peloso PFD, Leite CCF, Teixeira LA, Figueiredo AMS. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59:339-45.
42. Belkum Av, Melles DC, Peeters JK, Leeuwen WBV, Dyijkeren EV, Huijsdens XW, Spalburg E, Neeling Aj, Vebrugh HA. Methicillin-Resistant and –Susceptible *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in Pigs and Humans. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):479-83.
43. Welinder-Olsson C, Johansson-Florén K, Larsson L, Oberg S, Karlsson L, Ahrén C. Infection with panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis*. 2008. 14(8):1271-2.

## 5.2 Artigo Científico II

### GEORREFERENCIAMENTO E PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA PROVENIENTES DE PACIENTES VIVENDO COM HIV/AIDS E SEUS CONTACTANTES DOMICILIARES

Camila Sena Martins de Souza<sup>1,2</sup>, Letícia Chamma Lastoria<sup>1</sup>, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza<sup>1</sup>, Cassiano Victória<sup>3</sup>, José Eduardo Corrente<sup>4</sup>, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

<sup>3</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

<sup>4</sup> Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

#### Resumo

**Introdução:** *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um dos mais importantes agentes patogênicos e é reconhecido como uma ameaça para as pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA). Esse fato é agravado com a presença de fatores de virulência, uma vez que estes favorecem a sua permanência no hospedeiro e levam a uma maior gravidade das infecções. **Objetivo:** Investigar o perfil de virulência de *S. aureus* isolados de 368 PVHA (112 residentes na cidade de Botucatu e 256 na região) e 73 contactantes domiciliares dos pacientes residentes na cidade de Botucatu, além de realizar o georreferenciamento de acordo com a presença dos genes de virulência. **Metodologia:** Foi utilizado PCR para detecção do gene *mecA*, genes das enterotoxinas (*sea*, *seb*, e *sec-1*), esfoliatinas A e B (*eta* e *etb*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico



(*tst*), leucocidina Pantón-Valentine (*lukS-PV* e *lukF-PV*), hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*) e biofilme (*icaA* e *icaD*). Para a tipagem molecular foi utilizado a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* e *Multilocus Sequence Typing*. Além disso, foi realizado o georreferenciamento dos domicílios da cidade de Botucatu no momento da coleta.

**Resultados:** Os resultados demonstram uma prevalência significativa de genes de virulência nos isolados com destaque para genes das hemolisinas e genes para produção de biofilme. O dendrograma dos MRSA demonstra a grande semelhança na positividade dos genes de virulência entre os isolados do mesmo *cluster*. Além disso, é possível observar a variação da positividade para o gene *pvl* entre isolados que agruparam com o clone OSPC também positivo para o gene *pvl*. Em relação ao georreferenciamento dos domicílios com isolamento de *S. aureus* com genes mais prevalentes, observou-se a presença de áreas semelhantes entre os isolados de pacientes e contactantes domiciliares. **Conclusão:** O presente estudo revelou prevalência significativa de genes de virulência entre isolados de MRSA e MSSA provenientes de PVHA e seus contactantes, ressaltando a importância do MSSA. Não houve diferença estatística entre fatores de virulência dos isolados de pacientes e contactantes. Além disso, foi possível observar a semelhança da distribuição dos genes de virulência entre os isolados de *S. aureus* de PVHA e seus contactantes na cidade de Botucatu.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, pessoa vivendo com HIV/aids (PVHA), *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), fatores de virulência

## Introdução

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um dos mais importantes agentes patogênicos e é responsável por uma grande gama de infecções clínicas.<sup>1</sup> A diminuição da imunidade entre pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA) coloca-os em risco aumentado a várias infecções, incluindo as causadas por *S. aureus*, devido a sua elevada produção de fatores de virulência e por adquirir frequentemente resistência a antibióticos.<sup>2</sup>

A colonização nasal por *S. aureus* em PVHA é considerada um fator de risco para infecções invasivas, pois é frequentemente causada pelo isolado homólogo ao das narinas.<sup>3,4</sup>

Após a entrada no hospedeiro, um passo crítico para a infecção é a capacidade do agente patogênico de escapar do reconhecimento e destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro. Para este fim, *S. aureus* expressa muitos fatores de virulência que promovem a sobrevivência no hospedeiro e facilitam a patogênese. Para o sucesso da infecção *S. aureus* produz e secreta uma grande variedade de toxinas, proteínas de adesão, enzimas extracelulares e exotoxinas que são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções.<sup>5</sup>

O uso do georreferenciamento na área de saúde tem sido muito utilizado como instrumento de integração de dados ambientais e sociais com dados de saúde, permitindo melhor caracterização e quantificação da exposição, seus possíveis determinantes e os agravos à saúde.<sup>6</sup>

O objetivo desse estudo foi investigar o perfil de virulência entre *S. aureus* provenientes de PVHA e seus contactantes domiciliares, além de realizar o georreferenciamento de acordo com a presença dos genes de virulência nos isolados.

## **Material e Métodos**

### **Amostragem**

Os isolados são provenientes da nasofaringe e orofaringe de 368 (112 residentes em Botucatu) pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) acima de 15 anos que estavam frequentando regularmente o Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAE/DAM) do complexo da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Fundação para o Desenvolvimento Médico Hospitalar (FAMESP) e concordaram participar do estudo. A cidade possui aproximadamente 130.000 habitantes (22° 53' 09" S, 48° 26' 42" W) e é o único centro de referência da região compreendendo 500.000 pessoas.

Não houve critério de exclusão específico. No entanto, devido a restrições da legislação de ética não poderíamos incluir indivíduos desprovidos de liberdade no estudo.

Além disso, foi realizada a busca de contactantes no domicílio de cada paciente residente na cidade de Botucatu. Resumidamente, uma visita domiciliar foi agendada após a inclusão no estudo. Durante a visita foi realizada a segunda coleta do *swab* nasal e da orofaringe do paciente, a coleta de todos os contactantes domiciliares que não

estavam infectadas pelo HIV e por fim o georreferenciamento dos domicílios das famílias.

A terceira coleta dos pacientes foi realizada em retorno agendado para consultas médicas de rotina (em média, 3 meses após o primeiro levantamento).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicine de Botucatu, Brasil (nº do parecer: 1.168.173).

### **Identificação fenotípica e genotípica**

Os swabs foram semeados em ágar Baird-Parker e as colônias típicas submetidas ao método da coloração de Gram para analisar a pureza e observar a morfologia das colônias. Os micro-organismos foram identificados como descrito por Konemann et al,<sup>7</sup> e Cunha et al,<sup>8</sup>. Após a extração do DNA com *Kit Illustra* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) foi realizada a confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* através da detecção do gene que codifica o RNAr 16S e o fragmento de DNA específico SA442.<sup>9,10</sup>

### **Detecção do gene de resistência**

O gene *mecA* foi detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Em todas as reações foram incluídos controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923).<sup>11</sup>

### **Detecção dos genes de virulência**

Foi realizado PCR para detecção dos seguintes genes de virulência: enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), e para o gene da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) foram realizadas segundo Cunha et al<sup>12</sup> e Johnson et al,<sup>13</sup> hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), Marconi et al,<sup>14</sup> leucocidina Pantón-Valentine (*pvl*) e genes das toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*), Tristan et al<sup>15</sup> e Koning et al<sup>16</sup>, genes *icaA* e *icaD*, Arciola et al.<sup>17</sup>

### **Visualização dos produtos amplificados**

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1,0X. Como padrão foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com SYBR Safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

### **PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis**

A tipagem por PFGE foi realizada segundo o protocolo modificado de McDougal et al.<sup>18</sup>. As amostras foram colocadas em caldo BHI para o crescimento durante 24 horas. Em um microtubo, foram adicionados 400µl da amostra e centrifugada à 12.000rpm por 50 segundos. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 5µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose *low melt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues, após a solidificação foram colocadas em placa de 24 poços com 2 ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por no mínimo 4 horas. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2 ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente com intervalos de meia hora.

Para a restrição do DNA genômico foi utilizada a enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá). A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (*New England BioLabs*) como marcador molecular. O gel foi corado com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 1 hora, e fotografado sob transiluminação UV.

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,25 e 0,5% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice  $\geq 80\%$  foi escolhido para determinação dos *clusters*.

### **MLST – Multilocus Sequence Typing**

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al.<sup>19</sup> Cada par

de *primer* amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb), estes são demonstrados na **Tabela 1**: carbamatoquinase (*arcc*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glp*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*).

A purificação foi realizada pelo *Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e a reação de sequenciamento é descrita abaixo. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>).

**Tabela 1.** Sequência de *primers* utilizados na PCR

| Gene                                 | Iniciador       | Sequência (5'-3')        | Tamanho do produto Amplificado (pb) |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Carbamato quinase                    | <i>arcC</i> -Up | TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC  | 570                                 |
|                                      | <i>arcC</i> -Dn | AGGTATCTGCTTCAATCAGCG    |                                     |
| Desidrogenase do chiquimato          | <i>aroE</i> -Up | ATCGGAAATCCTATTTACATTC   | 536                                 |
|                                      | <i>aroE</i> -Dn | GGTGTTGTATTAATAACGATATC  |                                     |
| Glicerol quinase                     | <i>glpF</i> -Up | CTAGGAAGTGAATCTTAATCC    | 534                                 |
|                                      | <i>glpF</i> -Dn | TGGTAAATCGCATGTCCAATTC   |                                     |
| Guanilato quinase                    | <i>gmk</i> -Up  | ATCGTTTTATCGGGACCATC     | 488                                 |
|                                      | <i>gmk</i> -Dn  | TCATTAACATAACGTAATCGTA   |                                     |
| Fosfato acetiltransferase            | <i>pta</i> -Up  | GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG  | 575                                 |
|                                      | <i>pta</i> -Dn  | GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA  |                                     |
| Triose-fosfato isomerase             | <i>tpi</i> -Up  | TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA | 475                                 |
|                                      | <i>tpi</i> -Dn  | TTTGACCTTCTAACAATTGTAC   |                                     |
| Acetil coenzima A acetil transferase | <i>yqiL</i> -Up | CAGCATACAGGACACCTATTGGC  | 598                                 |
|                                      | <i>yqiL</i> -Dn | CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC  |                                     |

Fonte: Enright et al<sup>19</sup>

### Reação de sequenciamento

As reações foram realizadas em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelos programas Mega, Laser Gene e *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

### Georreferenciamento

Durante as visitas domiciliares, nos casos em que houve consentimento favorável, o posicionamento geográfico dos domicílios foi aferido por aparelho GPS Garmin

Montana 650, anotando-se a latitude e longitude. Para evitar identificação do local exato de residência, utilizamos protocolo de distorção aleatória. Os resultados foram analisados utilizando os *softwares* MapInfo (© MapInfo Corporation North Greensburg, NY, USA) e ArcGIS (©ESRI, San Diego, CA, USA) e sobreposto ao mapa da cidade de Botucatu e ao mapa do Estado de São Paulo para identificação de relações espaciais entre clones específicos de *S. aureus*.

## Resultados

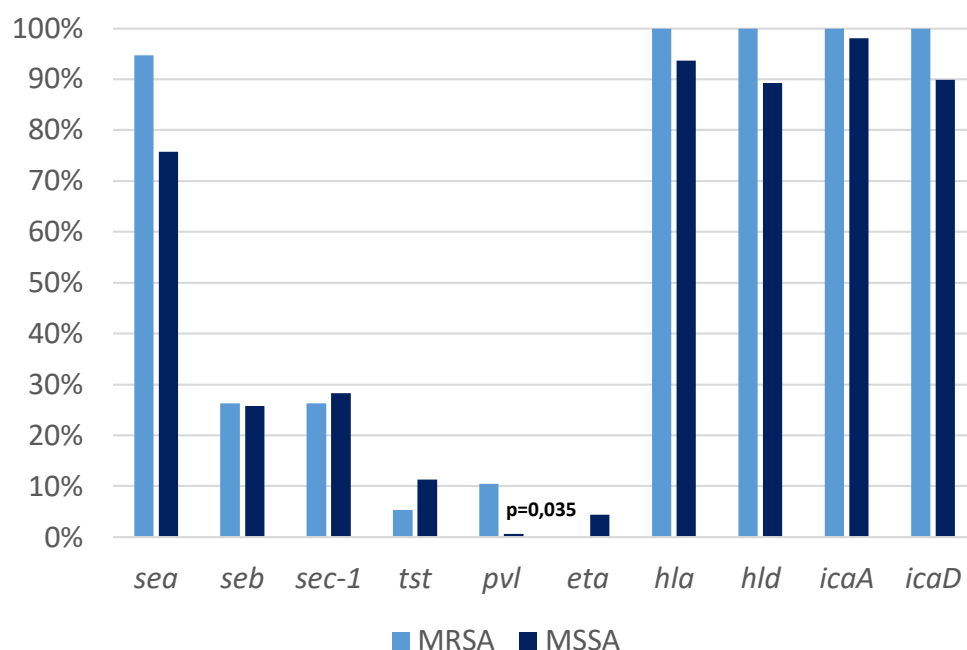
Entre o total de 178 isolados de *S. aureus*, 19 (10,6%) eram carreadores do gene *mecA*, dentre os quais quatro eram provenientes de contactantes domiciliares. Em relação aos genes das enterotoxinas, 77,5% (138) dos isolados carream o gene *sea*, 25,8% (46) foram positivas para o gene *seb* e por fim 28% (50) eram portadores do gene *sec-1*. É importante ressaltar que 64,6% (115) dos isolados apresentaram no mínimo positividade para um gene de enterotoxina. Além disso, dentre os isolados, oito carream os três genes simultaneamente e vale lembrar que três destes eram provenientes do mesmo paciente.

Um percentual considerável de 10,7% (19) dos isolados apresentaram o gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico. A presença do gene *pvl* foi detectada apenas em 1,7% (3) dos isolados. Em relação aos genes das hemolisinas alfa e delta, foram detectados em, respectivamente, 94,4% (168) e 90,4% (161). Dentre os isolados 97,8% (174) apresentaram ao menos um dos genes para hemolisinas.

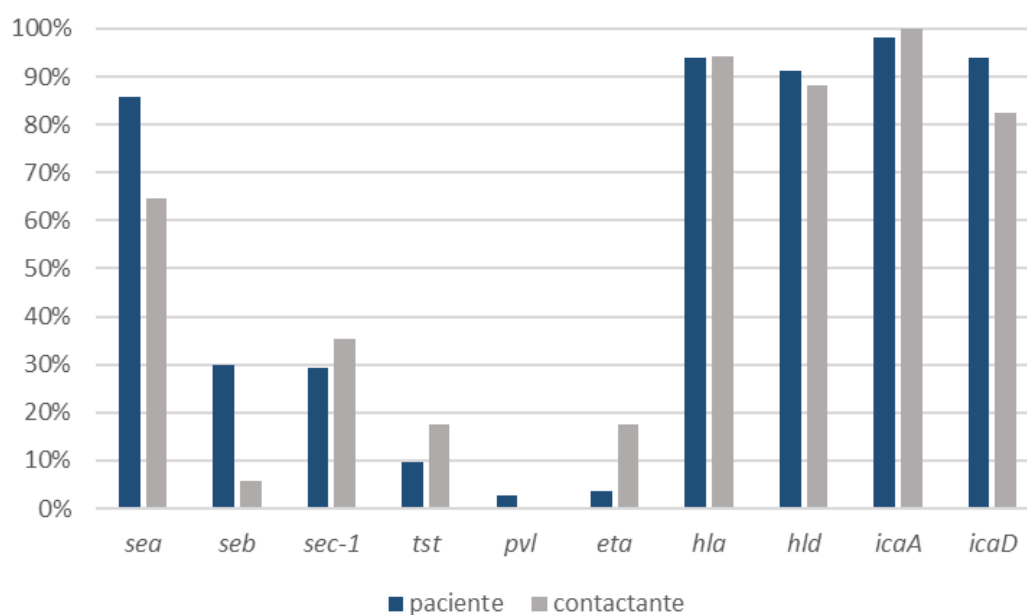
Em relação à produção de biofilme, 98,3% (175) foram positivas para o gene *icaA* e 91% (162) para o *icaD*. O gene da esfoliatina A (*eta*) era carregado por 3,9% (7) dos isolados, porém, o gene *etb* não foi detectado em nenhuma das amostras estudadas.

Por fim, vale ressaltar que todos os isolados eram carreadores de no mínimo dois genes de codificam fatores de virulência. A prevalência de genes dos fatores de virulência entre cepas MRSA e MSSA é demonstrada na **Figura 1**, com diferença significativa entre os grupos somente para o gene *pvl* ( $p=0,035$ ). A comparação entre a presença dos genes de fatores de virulência nas linhagens de *S. aureus* de PVHA e seus contactantes não revelou diferença estatística significativa para nenhum dos genes pesquisados (**Figura 2**). É importante ressaltar que quando os isolados eram provenientes do mesmo paciente foram incluídos apenas isolados com perfis diferentes na técnica de PFGE para a realização da análise apresentada nos gráficos. Casos em que

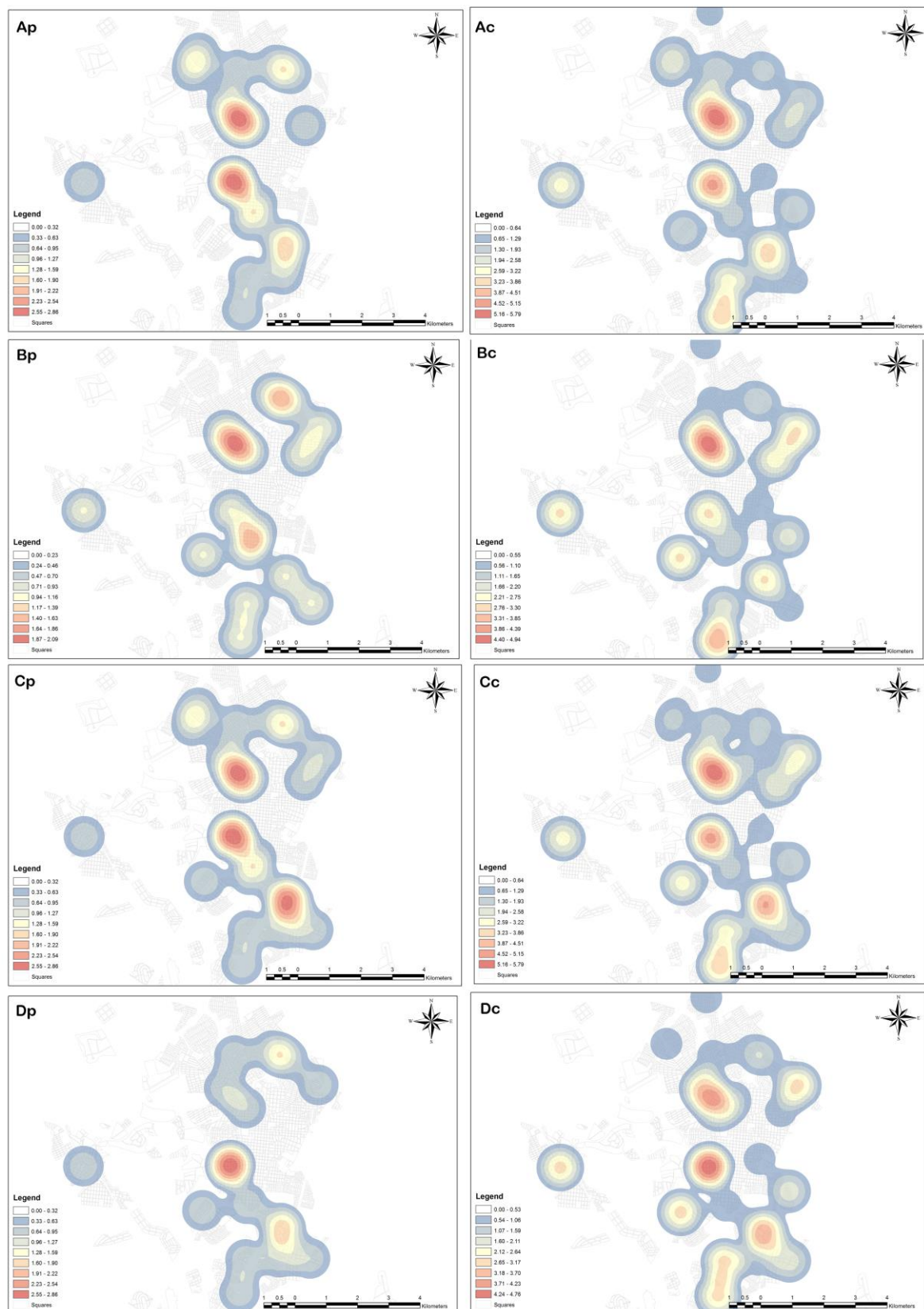
o paciente apresentava isolados semelhantes nas narinas e orofaringe foram excluídos da análise. A análise do georreferenciamento dos domicílios de pacientes e contactantes que carregavam isolados com genes de virulência mais frequentes (A: *hla*, B: *hld*, C: *icaA* e D: *icaD*) é apresentado na **Figura 3**.



**Figura 1.** Investigação dos genes de virulência em cepas MRSA e MSSA isoladas de pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e seus contactantes domiciliares.



**Figura 2.** Comparação entre os genes de virulência presentes em linhagens de *S. aureus* provenientes de PVHA e seus contactantes domiciliares.



**Figura 3.** Georreferenciamento dos domicílios de pacientes e contactantes que carregavam isolados com genes de virulência mais frequentes (A: *hla*, B: *hld*, C: *icaA* e D: *icaD*) p=paciente e c=contactante domiciliar.



Em geral, pacientes e contactantes domiciliares possuem áreas semelhantes em relação à positividade de isolados com o gene *hla*. Pode-se observar que existem duas áreas quentes (vermelha), ou seja, com maior número de casos positivos entre pacientes (Ap) e contactantes domiciliares (Ac), apesar da intensidade não ser igual, a **Figura 3 (Ap e Ac)** demonstra que as áreas com maior concentração são as mesmas para pacientes e contactantes domiciliares.

A **Figura 3 (Bp e Bc)** que representam o gene *hld* também demonstram semelhanças entre pacientes e contactantes domiciliares, uma vez que a área com maior concentração se encontra na mesma região em ambos os mapas.

Em relação à representação do gene *icaA* na **Figura 3 (Cp e Cc)** pode-se observar a presença de áreas quentes nas mesmas regiões, mas com uma diferença considerável na intensidade das áreas quentes. Já o gene *icaD* na **Figura 3 (Dp e Dc)** revelam maior concentração na mesma região para pacientes e contactantes domiciliares, no entanto, demonstra uma distribuição com maior número de casos por região na figura que representa os contactantes domiciliares.

Em relação a técnica de PFGE, entre os isolados resistentes foram obtidos 2 *clusters* majoritários (A e B), onde alguns isolados agruparam com clones importantes como USA 800 (Clone Pediátrico) e OSPC (Clone Oceania Sudoeste do Pacífico) (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Principais agrupamentos e características dos isolados de *S. aureus* tipados pelo PFGE e MLST, presença de genes de virulência e origem.

| PFGE<br>MRSA                       | MLST   | Presença genes de<br>virulência                                                                                                          | Origem (n)                                           | Total* |
|------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------|
| A                                  | ST1176 | <i>sea</i> (4), <i>seb</i> (1), <i>sec-1</i> (1),<br><i>hla</i> (4), <i>hld</i> (4), <i>icaA</i> (4),<br><i>icaD</i> (4)                 | Fatura (1) Botucatu (1) Tietê (1)<br>Contactante (1) | 4      |
| B<br><i>Agrupou com<br/>USA800</i> | ST5    | <i>sea</i> (4), <i>seb</i> (2), <i>sec-1</i> (1),<br><i>hla</i> (5), <i>hld</i> (5), <i>tst</i> (1),<br><i>icaA</i> (5), <i>icaD</i> (5) | Pardinho (2) Contactante (2)<br>Botucatu (1)         | 5      |

**Agrupamentos importantes\*\***

| Obs.                                 | MLST  | Presença genes de<br>virulência                                                                                          | Origem (n)                                                                                                           | Total* |
|--------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Agrupou/<br>OSPC<br>94,7%<br>similar | ST30  | <i>sea</i> , <i>hla</i> , <i>hld</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i>                                                         | Botucatu                                                                                                             | 1      |
| MSSA<br>( <i>Apal</i> )              | ST398 | <i>sea</i> (9), <i>seb</i> (2), <i>sec-1</i> (1),<br><i>hla</i> (9), <i>hld</i> (9), <i>icaA</i> (9),<br><i>icaD</i> (9) | Conchas (2) Itapeva (1)<br>Botucatu (1) Itatinga (2)<br>Pereiras (1) Laranjal<br>Paulista (1) Cerqueira<br>César (1) | 9      |

\* Total de amostras agrupadas no *cluster*

\*\*Agrupamento importante: isolados que agruparam com clones de importância internacional  
(n): número de amostras positivas.

Alguns isolados sensíveis não foram possíveis de serem tipados pela enzima de restrição *SmaI*, diante disso, a tipagem foi realizada a enzima *Apal*, com agrupamento dos 9 isolados em um único *cluster* com 79,7% de similaridade e a detecção do ST398, clone internacional de grande importância clínica. Em relação à presença dos genes de virulência também é demonstrado a grande similaridade entre os isolados, com exceção de apenas três isolados que carregavam os genes *seb* e *sec-1*.

## Discussão

A análise da distribuição espacial dos casos de agravos à saúde em cidades pela técnica de georreferenciamento é uma importante ferramenta que colabora com estudos sobre a transmissibilidade nas regiões, principalmente nas periferias dos grandes centros urbanos e nas áreas de abrangência, possibilitando o acesso às informações necessárias para realizar a vigilância dos casos, criando condições para avaliar a necessidade de ações nessas determinadas áreas. Além disso, contribui com estudos de transmissão, disseminação e ações de controle de doenças e agravos de saúde de uma determinada área de abrangência.<sup>20</sup>

A análise da diferença em relação à presença dos genes de virulência em isolados de *S. aureus* provenientes de PVHA e seus contactantes domiciliares não foi estatisticamente significativa, confirmando os dados apresentados pelo georreferenciamento que apontam áreas de distribuição semelhantes em relação aos genes mais presentes nos isolados do estudo.

É importante ressaltar a alta frequência de isolados carreando genes de biofilme, já que estes desempenham importante papel na colonização e persistência desses micro-organismos causadores de infecções crônicas, permitindo a evasão do sistema imune e proteção contra a ação de antimicrobianos.<sup>21</sup>

Os resultados do estudo também demonstraram alta prevalência de genes de hemolisinas alfa e delta, assim como relatado por Souza e colaboradores<sup>22</sup> em estudo realizado com idosos, presidiários e pacientes de um ambulatório de Dermatologia.

Entre as enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb* e *sec-1*) a de maior prevalência no estudo foi a *sea*, seguida da *sec-1* e *seb*. A presença do gene *sea* em MRSA foi ligada à gravidade da infecção em estudo realizado com um jovem de uma cidade do interior, próxima a Botucatu que sofreu um trauma após uma partida de futebol e evoluiu para celulite, abscesso local, pneumonia e sepse grave.<sup>23</sup>

Blomqvist e colaboradores<sup>24</sup> encontraram alta frequência de isolados carreando o gene *seb* em PVHA. Em relação ao gene *tst*, resultados semelhantes foram relatados em estudo realizado a partir de amostras clínicas de pacientes de um hospital de ensino (11,64%).<sup>25</sup>

Entre os isolados resistentes foram obtidos 2 *clusters* majoritários (A e B), onde alguns isolados agruparam com clones importantes como USA 800 (Clone Pediátrico) e OSPC (Oceania Sudoeste do Pacífico). A caracterização desses clones é importante para

que sejam formuladas estratégias terapêuticas locais adequadas. Exemplificando, pode-se utilizar um conhecimento mais completo dos clones circulantes em determinada região para avaliar a relação entre tipos clonais, sintomas da doença, escolha dos antibióticos e resultados clínicos. As linhagens MRSA causam tipos variados de infecções, que vão, quanto à gravidade, desde abscessos cutâneos até fasciíte e pneumonia necrosantes, com risco para a vida dos pacientes. Habitualmente, a gravidade da doença está diretamente ligada à produção de fatores de virulência, como toxinas ou biofilmes protetores.

Um fator de virulência que podemos destacar atualmente é a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), uma leucotoxina bicomponente formadora de poros com a habilidade de lisar leucócitos e é codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*. Sua apresentação clínica em humanos é infecção severa de pele e tecidos moles e pneumonia necrotizante. É interessante relatar que apesar da baixa prevalência do gene da PVL, somente isolados provenientes dos pacientes carregavam o gene da PVL no momento da coleta. Vyas e colaboradores<sup>26</sup> também encontraram isolados positivos para o gene da PVL em pessoas infectadas com HIV.

Somente o gene da PVL foi estatisticamente relevante ( $p=0,035$ ) entre MRSA e MSSA. Diferente dos resultados apresentados, Imaz e colaboradores<sup>27</sup> não encontraram isolados MRSA carregando o gene da PVL em estudos realizados com pacientes infectados por HIV. Entretanto, Blomqvist e colaboradores<sup>24</sup> relataram alta taxa de isolados carregando o gene da PVL (73,3%) dentre isolados MRSA e MSSA.

Os resultados revelaram semelhança de positividade entre os isolados resistentes para os genes de fatores de virulência dentro do mesmo *cluster*, além disso, é importante ressaltar características moleculares compatíveis com o clone ST30 – OSPC, positivo para o gene *pvl* que agrupou com isolados que também carregavam esse gene.

Entre as esfoliatinas, foi encontrado tanto PVHA quanto contactantes domiciliares carregando isolados portadores do gene *eta*. No entanto, nenhum isolado carregava o gene *etb* no momento da coleta. Este resultado corrobora com um estudo realizado com PVHA da Tailândia, onde foram encontrados isolados positivos para o gene *eta*, mas nenhum carregando o gene *etb*.<sup>24</sup>

A comparação da virulência entre MRSA e MSSA, demonstra a importância de isolados sensíveis que também podem carrear genes que codificam fatores de virulência importantes. Os 9 MSSA que agruparam em um único *cluster* e com ST 398, revela a

importância desse grupo. Embora o estudo sobre as cepas MRSA seja importante, um conhecimento mais detalhado sobre cepas MSSA também vem se destacando com grande importância na literatura. As cepas MSSA aparentemente não ganham destaque, pois o uso de antibióticos geralmente contém uma infecção causada pela mesma.

No caso da cepa ST398, os relatos encontrados na literatura descrevem um decurso diferente. Essa cepa possui uma variedade imensa de genes que codificam fatores de virulência que capacitam esta cepa a interagir com seu hospedeiro causando assim uma infecção grave ou até levar a óbito. Um exemplo que descreve bem a virulência dessa cepa foi demonstrado em estudo recente com pacientes do Hospital das clínicas da UNESP de Botucatu.<sup>28</sup> A linhagem ST398 foi identificada em pacientes hospitalizados na unidade de terapia intensiva (UTI) que utilizavam ventilação mecânica. Os pacientes colonizados por esta linhagem desenvolveram pneumonia e três (27%) dos cinco pacientes com a cepa ST398 foram a óbito. Assim como detectado nesse estudo também foi observado a presença dos genes que codificam  $\alpha$  e  $\delta$  toxinas, além da expressão aumentada dessas toxinas e das modulinas fenol solúveis (PSM) que também estão relacionadas com a lise de neutrófilos e eritrócitos humanos.

Informações mais acuradas acerca da distribuição e da virulência de clones de *S. aureus* em PVHA poderão ajudar os clínicos no entendimento do risco de infecção por certos clones e nas suas escolhas da antibioticoterapia empírica apropriada.

## Conclusão

O presente estudo revelou prevalência significativa de genes de virulência entre isolados de MRSA e MSSA provenientes de PVHA e seus contactantes domiciliares, ressaltando a importância do MSSA. Os *clusters* apresentaram semelhanças em seus fatores de virulência. Além disso, não houve diferença estatística entre a positividade e distribuição dos genes de virulência em *S. aureus* isolados de PVHA e de seus contactantes domiciliares na cidade de Botucatu.

## Referências

1. Tong, AYC; Davis, JS; Eichenberger, E; Holland, TL; Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3): 603-661, 2015.
2. Ferreira, DC; Silva, GR; Cavalcante, FS; Carmo, FL; Fernandes, LA; Moreira, S; Passos, MRL; Colombo, APV; Santos, KRN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV patients: Risk factors associated with colonization and/or infection and methods for characterization of isolates - a systematic review. *Clinics*. 69(10):770-776, 2014.
3. Olalekan, AO; Schaumburg, F; Nurjadi, D; Dike, AE; Ojurongbe, O; Kolawole, DO; Kun, JF; Zanger, P. Clonal expansion accounts for the excess of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* colonizing HIV-positive individuals in Lagos, Nigeria. *Antimicrob Agents*. 40(3):268-272, 2012.
4. Von Eiff, C; Becker, K; Machka, K; Stammer, H; Peters, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med*. 344(1): 11-16, 2001.
5. Malachowa N, Kobayashi SD, DeLeo F. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and athletes. *Physician Sports med*. 2012; 40(2):1-8.
6. Ministério da Saúde. Capacitação e atualização do geoprocessamento em saúde. Brasília, 2006.
7. Konemann EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
8. Cunha MLS, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(8):855-60.
9. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9):3332-8.
10. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(3):618-23.
11. 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(10):2240-4.
12. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RA, Araújo JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz J Micr*. 2006; 37: 64-69.
13. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of

genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29(3):426-30.

14. Marconi C, Cunha MLRS, Araújo 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(2):117-128.

15. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. Emerg Infect Dis. 2007;13(4):594-600.

16. Koning S, van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen J, et al. Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Panton-Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid pSK41. J Clin Microbiol. 2003;41(7):3017-21.

17. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2151-6.

18. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. J Clin Microbiol. 2003; 41(11):5113-20

19. 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(3):1008-15.

20. Nardi, SMT; Paschoal, JAA; Perdo, HSP; Paschoal VA; Sichieri, EP. Geoprocessamento em saúde pública: fundamentos e aplicações. Rev Inst Adolfo Lutz. 2013; 72(3):185-91

21. Oliveira, A; Pereira, VC; Pinheiro, L; Riboli, DFM ; Martins, KB; cunha, MLRS. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. Int. J. Mol. Sci. 17: 1423, 2016.

22. Souza, CSM; Fortaleza, CMCB; Witzel, CL, Silveira, M; Bonesso, MF; Marques, SA; Cunha, MLRS. Toxigenic profile of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated from special groups. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 15(9): 1-5,2016.

23. Camargo, CH; Cunha, MLRS; Bonesso, MF; Cunha, FP; Barbosa, NA; Fortaleza, CMCB. Systemic CA-MRSA infection following trauma during soccer match in inner Brazil: clinical and molecular characterization. Diagn Microbiol Infect Dis. 76(3): 372-4, 2013

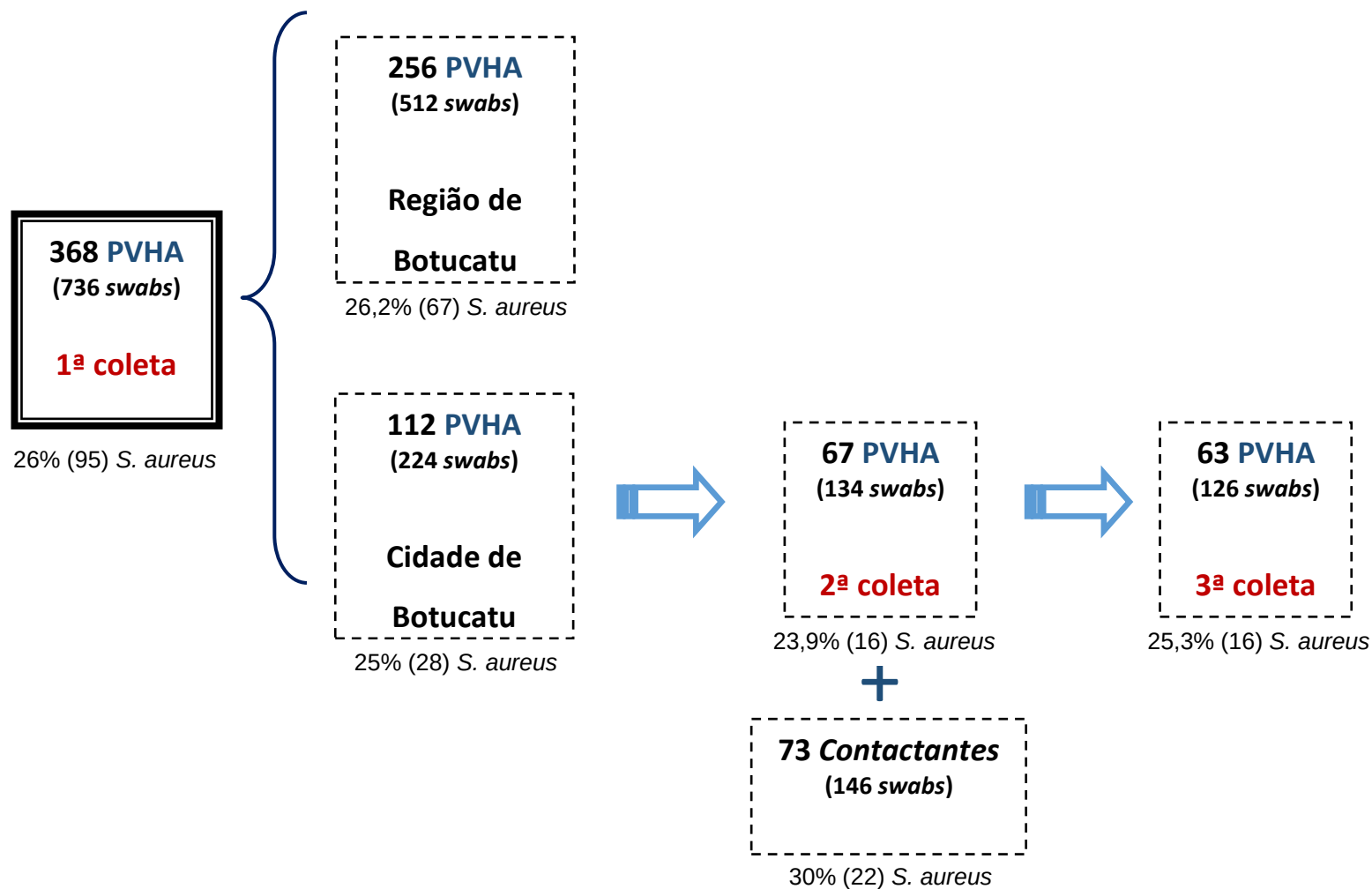
24. Blomqvist, S; Leonhardt, A; Arirachakaran, P; Carlen, A; Dahle, G. Phenotype, genotype, and antibiotic susceptibility of Swedish and Thai oral isolates of *Staphylococcus aureus*. J Oral Microbiol. 23(7):1-7, 2015.
25. Alfatemi, SMH; Motamedifar, M; Hadi, N; Saraie, SE. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Jundishapur J Microbiol. 7(6): e10741, 2014.
26. Vyas, K; Hospenthal, DR; Mende, K; Crum-Cianflone, NF. Recurrent Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in an HIV-Infected Person. J Clin Microbiol. 49(5): 2047–2053, 2011.
27. Imaz, A; Camoez, M; Di Yacovo S; Gasch, O; Domingez, MA; Vila, A; Maso-Serra, M; Pujol, M; Podzamczar, D. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in HIV-infected patients in Barcelona, Spain: a cross-sectional study. BMC Infect Dis. 15(243): 1-5,2015.
28. Bonesso, MF; Marques, AS; Camargo, CH, Fortaleza, CMCB; Cunha, MLRS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non-outbreak skin infections. BJM. 45: 1401-1407, 2014.



## 6. Conclusões

- Taxa de colonização nasal de *S. aureus* maior quando comparada a oral em PVHA;
- Similaridade entre isolados de *S. aureus* provenientes dos diferentes sítios de coleta (nasal e oral);
- Relação clonal entre *S. aureus* isolados de PVHA e de seus contactantes demonstrando uma possível disseminação intradomiciliar;
- Não houve diferença significativa quanto à presença dos genes que codificam fatores de virulência em *S. aureus* isolados de PVHA e de seus contactantes domiciliares e nem entre MRSA e MSSA, ressaltando a importância do MSSA que também pode carrear genes que codificam fatores de virulência importantes;
- Alta densidade de *S. aureus* em uma determinada região não significa presença de maior número de isolados resistentes;
- Foram encontrados MRSA de PVHA e de seus contactantes que agruparam com importantes clones internacionais, como USA 800 e OSPC;
- MSSA que agruparam em um único *cluster* com características moleculares compatíveis com o clone ST398, revela a importância desse grupo.

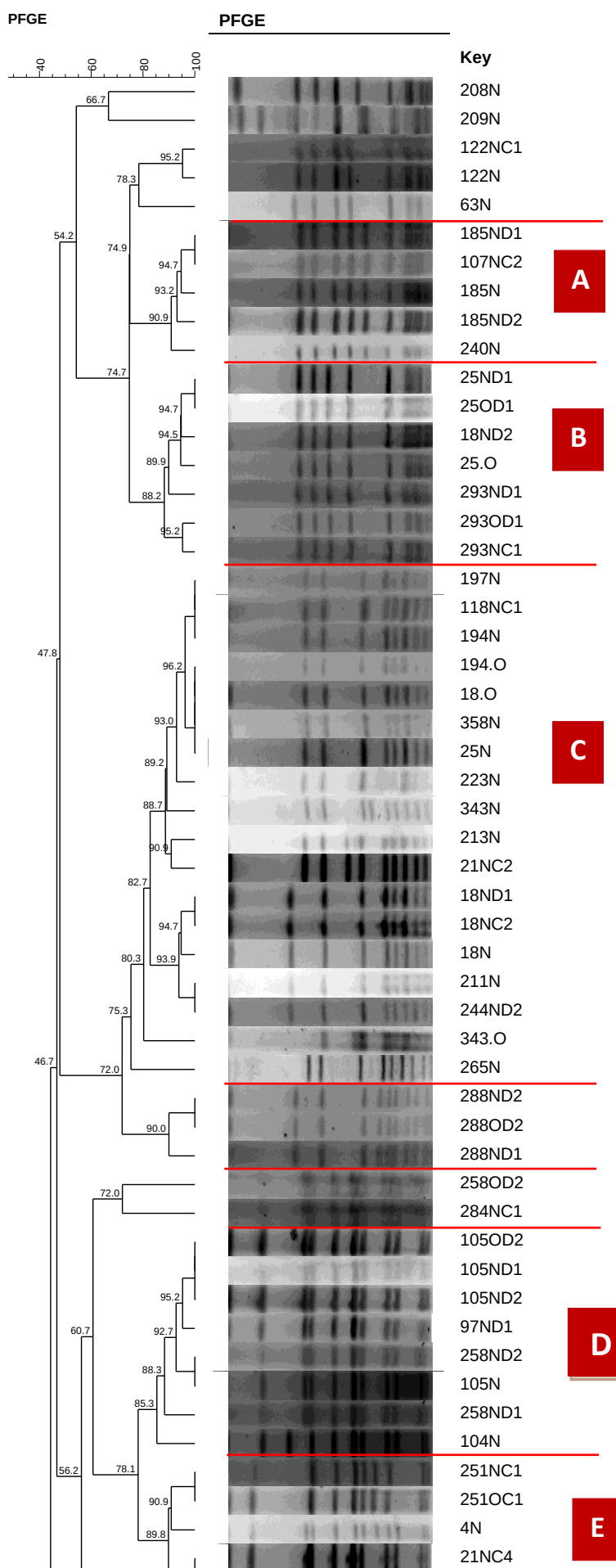
### Fluxograma geral de coleta

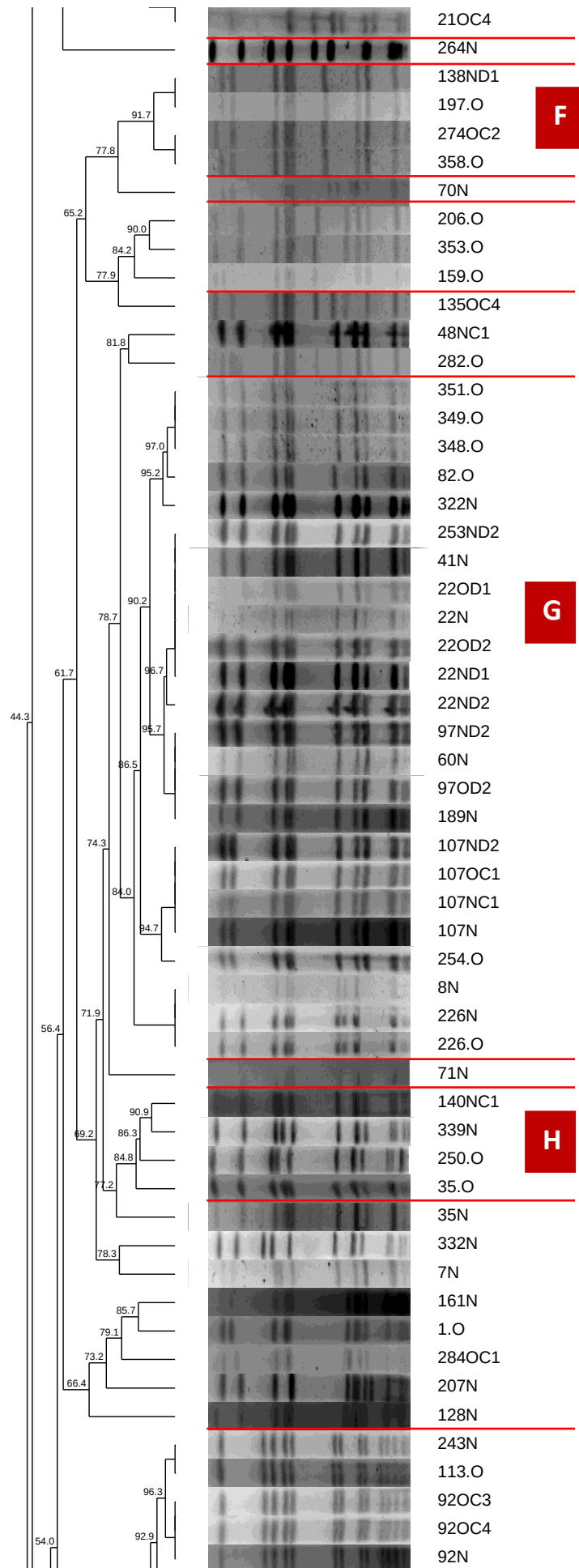


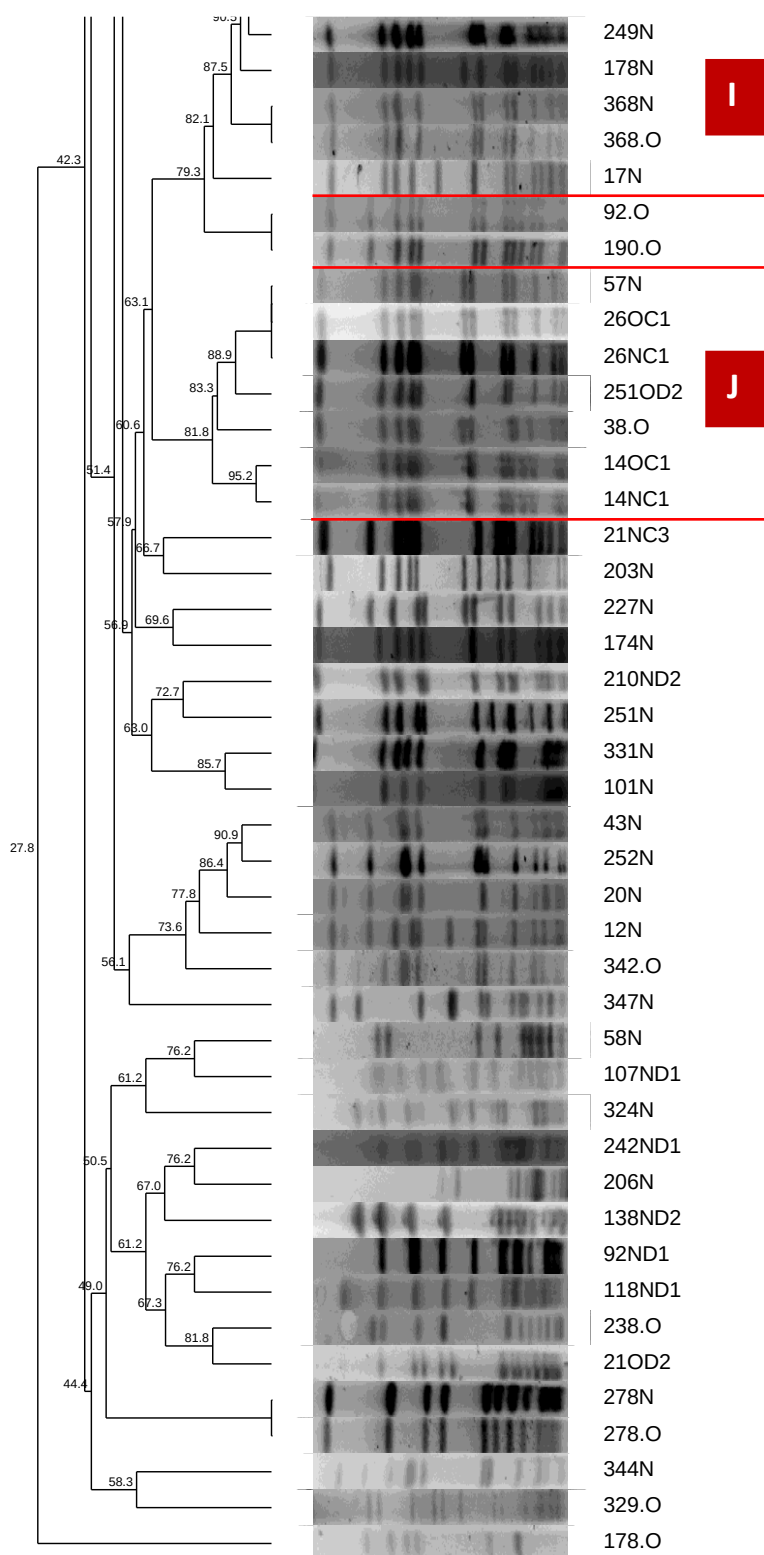
**Anexo I.** Fluxograma geral de coleta das pessoas vivendo com HIV/aids e seus contactantes domiciliares.

**\*Obs.** Quando o paciente carrega *S. aureus* em ambos sítios de coleta foi contabilizado somente um isolado para o cálculo da prevalência.

## Dendrograma MSSA







**Anexo II.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) de MSSA provenientes de PVHA e seus contactantes domiciliares.