

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* EM  
PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM  
INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS NO  
MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP.

**LUCAS PORANGABA SILVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de  
Parasitas e Micro-organismos*.

*Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

**BOTUCATU – SP  
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* EM  
PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM  
INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS NO  
MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP.

**LUCAS PORANGABA SILVA**

**Orientadora: MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA**

**Coorientador: CARLOS MAGNO CASTELO BRANCO FORTALEZA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de  
Parasitas e Micro-organismos*.

*Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

**BOTUCATU – SP  
2019**

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Silva, Lucas Porangaba.

Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* em pacientes acamados em domicílio ou vivendo em instituições de longa permanência para idosos no município de Botucatu, SP / Lucas Porangaba Silva. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza  
Capes: 20000006

1. Epidemiologia molecular. 2. Idoso. 3. *Staphylococcus aureus*.  
4. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 5. Instituição de longa permanência para idosos.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; MRSA; Pacientes acamados; População idosa; *Staphylococcus aureus*.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

*Cora Coralina.*

**Aos meus pais José Antônio Neto e Maria da Penha Porangaba,**  
pelo imenso amor, carinho e motivação que me foram dados.

**À minha querida irmã Paloma Porangaba da Silva,**  
por todo apoio e disposição em ajudar.

Agradeço a Deus por tudo o que fez em minha vida, onde, diante de tanta coisa boa, me faz questionar se sou realmente digno de tamanha felicidade. Sei que nada seria possível sem a sua vontade e por isso sou eternamente grato.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, por ser um exemplo que me inspirou a sempre melhorar e correr atrás dos meus objetivos. Obrigado por toda atenção e pelo voto de confiança depositado em mim. Saiba que minha maior preocupação era desapontá-la de alguma forma.

À minha mãe Maria da Penha Porangaba e irmã Paloma Porangaba da Silva. Não há como mensurar tamanha disposição em ajudar. Obrigado pelo apoio e incentivo de sempre. Não sei o que seria de mim sem vocês.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia – IBB/UNESP, Nathalia Bibiana Teixeira, Thaís Alves Barbosa, Ana Cláudia Moro, Elka Machado Ferreira, Mariana Poianas Silva, Carolina Destro de Angelis, por fazerem meus dias mais felizes e tornando o ambiente mais alegre. Obrigado pela companhia e por toda ajuda que me deram. Aprendi muito com vocês e por isso sou eternamente grato.

À Monica da Silveira, minha querida amiga, que acredita mais em mim do que eu mesmo. Sua amizade faz a diferença em minha vida. Sempre me dando suporte e compartilhando dos momentos, bons e ruins. Obrigado por tudo. Sei que posso sempre contar com você.

À Alessandra Lazarini, pelas ajudas prestas nos momentos de imprevisto que com certeza fizeram a diferença. Espero um dia poder retribuir tudo o que você fez para me ajudar. Muito obrigado.

Aos meus colegas discentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Aislan Quintiliano Delgado, Ana Julia Vieira, Ariana Musa de Aquino, Caroline Faganello, Jéssica Silvino Valente, Juliana Helena dos Santos de Toledo, Luan Felipe Toro, Luciana Pupo da Silveira Lyra e Thamiris Moreira Figueiredo. A vida não podia me presentear com companhia melhor do que vocês.

À todos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia. Em especial, Ana Claudia Acerra, Aline Parisoto Missio, Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira, Rafael Scarpim,

Silvia Helena Ferreira e Profa. Dra. Terue Sadatsune. Por toda competência, profissionalismo e disposição.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial a Davi Barcello de Oliveira Muller pela eficácia e ótimo atendimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo (Processo 88882.183592/2018-01).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro do Projeto (Processo N. 2017/21296-0).

Também à aqueles, não nomeados aqui, mas que de alguma forma me ajudaram na elaboração deste trabalho. Não se chega a lugar nenhum sozinho e sei que contei com muita ajuda de pessoas dispostas a me ver atingir esse objetivo. Obrigado a todos.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>11</b>
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
1.2 Idosos e Envelhecimento.....	13
1.3 Domicílio e as Instituições de Longa Permanência para Idosos (ILPI's).....	15
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
<b>4. Referências.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Apresentação da dissertação.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Artigo .....</b>	<b>23</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Anexo I .....</b>	<b>49</b>
<b>9. Anexo II .....</b>	<b>50</b>

## Resumo

A epidemiologia das infecções estafilocócicas tem sofrido importante modificação nas últimas décadas. A emergência de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associados à comunidade (CA-MRSA) representa risco especial para populações reconhecidamente vulneráveis como os idosos. Neste âmbito, duas situações distintas são de especial interesse: os indivíduos institucionalizados, vivendo em casas de repouso, que representam um espaço intermediário entre a comunidade e o hospital; e os dependentes (acamados) cuidados em domicílio, expostos de forma intermitente aos serviços de saúde. Nosso objetivo foi identificar a prevalência e fatores associados ao carreamento nasal, oral e retal de *S. aureus* e MRSA em indivíduos acamados ou residindo em instituições de longa permanência para idosos (ILPIs) no município de Botucatu, SP, bem como a identificação de clones importantes de *S. aureus* e MRSA nessa população. Estudo com delineamento transversal, em que *swabs* da nasofaringe, orofaringe e reto de 226 indivíduos (150 residentes em nove ILPIs e 76 acamados em domicílio) foram coletados juntamente com um questionário que, através de entrevista com o próprio indivíduo ou responsável legal, levantou informações como dados demográficos (gênero e idade), tempo de institucionalização ou restrição ao leito, dados clínicos (comorbidades), dispositivos invasivos, internações recentes, doenças infecciosas e uso de antimicrobianos, para identificação dos fatores de risco. O isolamento de *S. aureus* foi realizado em Ágar Baird Parker e a identificação foi realizada por provas bioquímicas e confirmação genotípica. Para detecção do gene *mecA* utilizou-se PCR, caracterização de SCC*mec* por PCR Multiplex e tipagem molecular dos MRSA pela técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). A prevalência global de *S. aureus* identificada foi de 33,6% (76) e 8% (18) de MRSA. Quanto aos idosos das nove ILPIs, a prevalência de *S. aureus* variou de 16,6% a 85,7% e a de MRSA de 13,3% a 25%. Dos 76 indivíduos acamados 20 (26,3%) estavam colonizados com *S. aureus* e desses, quatro (5,2%) eram portadores de MRSA. Dos 20 MRSA, seis carregavam o SCC*mec* do tipo IV, nove com SCC*mec* do tipo II e um com SCC*mec* tipo I. A análise estatística multivariada dos fatores de risco para carreamento de *S. aureus* nos indivíduos incluídos no estudo (acamados e idosos residentes em ILPIs) revelou associação positiva com residentes em ILPIs (OR=2,05, IC95%=1,07-3,91,  $p=0,03$ ), com o sexo masculino (OR=2,15, IC95%=1,22-3,79,  $p=0,008$ ), com histórico de cirurgias (OR=5,99, IC95%=1,26-28,92,  $p=0,02$ ), com a presença de comorbidades pelo Charlson score (OR=1,35, IC95%=1,01-1,92,  $p=0,047$ ) e associação negativa com doenças cardíacas (OR=0,18, IC95%=0,05-0,70,  $p=0,01$ ). Para o carreamento de MRSA a análise multivariada revelou associação positiva com sexo masculino (OR=3,29, IC95%=1,18-9,17,  $p=0,02$ ). A tipagem por PFGE dos MRSA revelou a presença de cinco *clusters*, sendo que a maioria agrupou isolados da

ILPI de maior porte, e com similaridade com MRSA de diferente ILPI. Os resultados do PFGE também mostraram similaridade entre MRSA isolado de indivíduo acamado e de ILPI. Com os dados obtidos é possível compreender melhor a epidemiologia de *S. aureus* e MRSA na população estudada. Os resultados descritos ressaltam o papel que as instituições de pequeno e médio porte desempenham pela alta prevalência de MRSA que possuem. Além disso, o alto número de MRSA de origem oral mostra a importância de estudar esse sítio geralmente negligenciado.

**Palavras-chave:** população idosa, ILPIs, pacientes acamados, *Staphylococcus aureus*, MRSA, epidemiologia molecular.

## Abstract

The epidemiology of staphylococcal infections has undergone important changes in recent decades. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) strains represents a special risk to populations recognized as vulnerable, such as the elderly. Within this context, two different situations are of special interest: institutionalized individuals living in nursing homes, which represent an intermediary space between the community and the hospital, and dependent (bedridden) patients cared for at home, who are intermittently exposed to health services. Our objective was to determine the prevalence and factors associated with nasal, oral and rectal carriage of *S. aureus* and MRSA in bedridden patients and residents of long-term care facilities (LTCF) for the elderly in the city of Botucatu, SP, and to identify important *S. aureus* and MRSA clones in this population. In a cross-sectional study, nasopharyngeal, oropharyngeal and rectal swab samples were collected from 226 individuals (150 individuals from nine LTCF and 76 bedridden patients living at home). In addition, a questionnaire was applied by interview with the subject himself or the legal representative for the collection of demographic data (gender and age), length of institutionalization or bedridden period, clinical data (comorbidities), invasive devices, recent hospitalizations, infectious diseases, and antimicrobial use in order to identify risk factors. *Staphylococcus aureus* was isolated on Baird Parker agar and identified by biochemical tests and genotypic confirmation. PCR was used for detection of the *mecA* gene and multiplex PCR for characterization of SCC*mec*. Molecular typing of MRSA was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The overall prevalence of *S. aureus* was 33.6% (n = 76) and that of MRSA was 8% (n = 18). Among the elderly individuals from the nine LTCF, the prevalence of *S. aureus* ranged from 16.6% to 85.7% and that of MRSA from 13.3% to 25.0%. Twenty (26.3%) of the 76 bedridden individuals were colonized with *S. aureus* and four of them (5.2%) were carriers of MRSA. Among the 20 MRSA isolates, six harbored SCC*mec* Type IV, nine SCC*mec* Type II, and one SCC*mec* Type I. Multivariate analysis of risk factors for *S. aureus* carriage in the individuals included in the study (bedridden patients and elderly residents of LTCF) revealed a positive association with residency in LTCF (OR=2.05, 95%CI=1.07-3.91,  $p=0.03$ ), male gender (OR=2.15, 95%CI=1.22-3.79,  $p=0.008$ ), history of surgeries (OR=5.99, 95%CI=1.26-28.92,  $p=0.02$ ) and presence of comorbidities according to the Charlson score (OR=1.35, 95%CI=1.01-1.92,  $p=0.047$ ), and a negative association with heart diseases (OR=0.18, 95%CI=0.05-0.70,  $p=0.01$ ). For MRSA carriage, multivariate analysis showed a positive association with male gender (OR=3.29, 95%CI=1.18-9.17,  $p=0.02$ ). Typing of MRSA by PFGE revealed the presence of five clusters. Most clusters contained isolates from larger LTCF and similarity was observed between MRSA from different LTCF. The PFGE results also showed

similarity between MRSA isolated from bedridden patients and LTCF residents. The results contribute to a better understanding of the epidemiology of *S. aureus* and MRSA in the population studied. The findings emphasize the role of small and medium-sized institutions due to the high prevalence of MRSA found. In addition, the large number of MRSA of oral origin highlights the importance of studying this generally neglected site.

**Keywords:** elderly population, LTCF, bedridden patients, *Staphylococcus aureus*, MRSA, molecular epidemiology

# 1. Introdução

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Os patógenos são capazes de se espalhar, criar reservatórios, colonizar e causar doença. Eles podem também adquirir genes de resistência aos agentes antimicrobianos<sup>1</sup>. O *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno associado a doenças nosocomiais e adquiridas na comunidade. Pode ser tanto um comensal humano quanto um agente patogênico e frequentemente causa infecções clínicas, como infecções da pele e de tecidos moles. Embora possam estar presentes em vários locais do corpo, a nasofaringe e orofaringe são os locais mais frequentes<sup>2</sup>. *S. aureus* possui a capacidade de colonizar assintomaticamente pessoas normais. Estima-se que cerca de 20 a 40% da população mundial são portadores nasais assintomáticos de *S. aureus* e com isso estão em maior risco de infecção<sup>3</sup>.

A transmissão de *S. aureus* se dá principalmente por contato direto, contato pele-a-pele com indivíduos colonizados ou infectados, mas o contato com objetos contaminados e superfícies também podem desempenhar um papel na transmissão. A perda da barreira normal da pele, a presença de doenças como diabetes e síndrome da imunodeficiência adquirida e defeitos na função de neutrófilos predis põem à infecção<sup>4</sup>.

Cepas resistentes à meticilina surgiram durante a década de 1960 na Europa, em 1970 nos Estados Unidos e em outros lugares, e rapidamente se tornaram um grande problema clínico<sup>5</sup>. Os genes de resistência possuem uma gama muito ampla de elementos e os envolvidos na disseminação da resistência e virulência dos estafilococos são: ilhas genômicas; bacteriófagos; ilhas de patogenicidade; cassetes cromossômicos; plasmídeos, sequências de inserção e transposons<sup>1</sup>.

A resistência à meticilina em estafilococos se codifica através do gene *mecA* que está presente no Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*). O gene de resistência *mecA*, codifica uma proteína ligadora de penicilina (PBP) adicional, PBP2a, que possui uma baixa afinidade para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos<sup>1</sup>. Até o momento 13 tipos de SCC*mec* (I ao XIII) foram descritos<sup>6, 7, 8</sup> (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Tipos de SCCmec atualmente identificados em cepas de *S. aureus*.

<b>Tipo SCCmec</b>	<b>Complexo gene <i>ccr</i></b>	<b>Complexo gene <i>mec</i></b>
<b>I</b>	1 (A1B1)	B
<b>II</b>	2 (A2B2)	A
<b>III</b>	3 (A3B3)	A
<b>IV</b>	2 (A2B2)	B
<b>V</b>	5 (C1)	C2
<b>VI</b>	4 (A4B4)	B
<b>VII</b>	5 (C1)	C1
<b>VIII</b>	4 (A4B4)	A
<b>IX</b>	1(A1B1)	C2
<b>X</b>	7(A1B6)	C1
<b>XI</b>	8(A1B3)	E
<b>XII</b>	9 (C2)	C2
<b>XIII</b>	9 (C2)	A

Fonte: International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG-SCC), SCC Classification [6], Sharmin Baig *et al* [8].

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) têm sido reconhecido como uma das principais causas de infecções hospitalares em todo o mundo. As infecções ocorrem predominantemente em hospitais, e são chamados de *hospital-acquired* MRSA (HA-MRSA). No entanto, a incidência de infecções adquiridas na comunidade, *community-acquired* MRSA (CA-MRSA), tem aumentado<sup>9</sup>. Os tipos de SCCmec IV e V têm sido associados com as cepas de MRSA disseminados na comunidade<sup>10</sup>.

No Brasil, Ribeiro *et al* (2005)<sup>11</sup> descreveram os primeiros casos de CA-MRSA em Porto Alegre com amostras obtidas em 2002 e 2003<sup>11,12</sup>. Outro estudo desenvolvido por Ribeiro *et al* (2007) também revelou CA-MRSA no Rio de Janeiro entre os isolados obtidos entre 2004 e 2006<sup>12,13</sup>. Carmo *et al* (2011) também descreveram isolados de CA-MRSA em São Paulo<sup>14</sup>. Entretanto o número de estudos realizados com MRSA de origem comunitária no Brasil ainda carece e não se permite estabelecer uma estimativa segura sobre a situação.

A infecção por MRSA está cada vez mais difícil de tratar, pois cepas multirresistentes estão em ascensão, levando a altas taxas de mortalidade em seres humanos<sup>9</sup>. A higienização das mãos, culturas de vigilância na admissão dos novos pacientes, precauções de contato para os pacientes com MRSA seguida de descolonização e uma contínua educação dos profissionais de saúde são ações consideradas bem-sucedidas na redução da transmissão de MRSA em ambiente endêmico<sup>15</sup>.

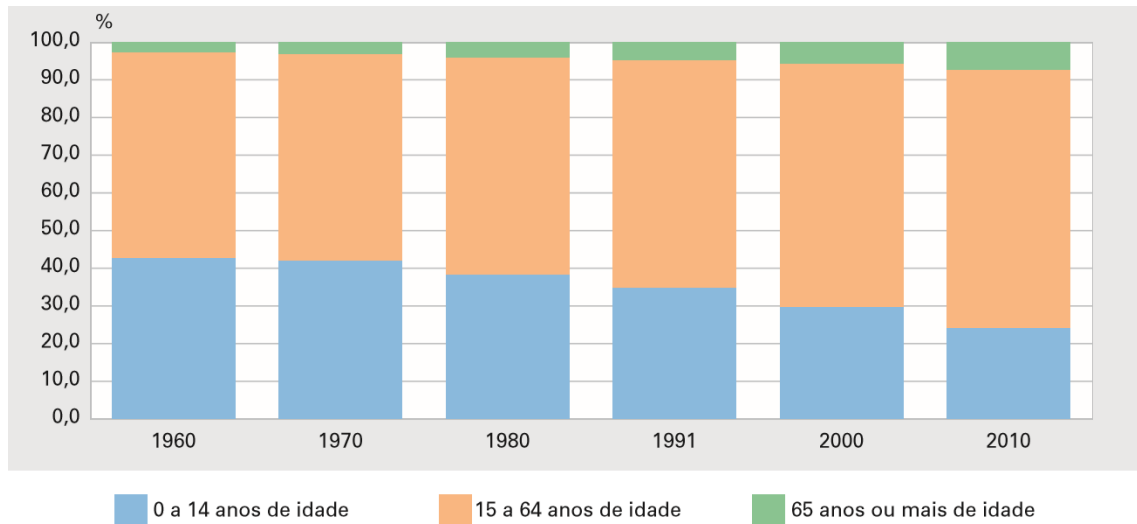
Um dos ambientes capazes de promover a aquisição e disseminação de MRSA são justamente as casas de repouso para idosos, onde há a transmissão cruzada devido a permanência em ambiente confinado e pela redução a adesão de medidas higiênicas causadas pelo comprometimento cognitivo<sup>16</sup>. Isso coloca os moradores em constante risco de colonização e infecção por este micro-organismo. Além disso, a resistência do MRSA a antibióticos de primeira linha como penicilinas traz risco para os pacientes imunocomprometidos e torna a infecção mais difícil de tratar<sup>15</sup>.

## **1.2 Idosos e Envelhecimento**

Envelhecimento populacional se tornou real mesmo para países em desenvolvimento<sup>17</sup>. Embora a melhora dos parâmetros de saúde não se distribua de forma homogênea envelhecer não é mais algo exclusivo de países desenvolvidos<sup>18</sup>. A Revisão de 2015 da Organização das Nações Unidas (ONU) “Previsões sobre a população mundial” mostrou que nos últimos anos foram alcançados ganhos significativos na expectativa de vida. Em 2010-2015 a expectativa de vida na África foi de 60 anos, na Ásia 72 anos, na América Latina e no Caribe 77 anos, na Europa e na Oceania 79 anos e na América do Norte 79 anos. Em nível global, entre 2000-2005 a 2010-2015, houve aumento de três anos na expectativa de vida passando de 67 para 70 anos e está projetada ainda para aumentar para 77 anos em 2045-2050 e para 83 anos em 2095-2100<sup>19</sup>.

Em 2015, 901 milhões de pessoas tinham 60 anos ou mais representando 12% da população global. As principais regiões do mundo, exceto a África, terão até 2050 quase um quarto ou mais de suas populações com 60 anos ou mais. Essa população cresce a uma taxa de 3,3% por ano. O número de pessoas idosas no mundo está projetado para ser 1,4 bilhões em 2030 e 2,1 bilhões em 2050, e pode subir para 3,2 bilhões em 2100<sup>19</sup>.

No Brasil os índices etários mudaram profundamente nos últimos 50 anos. Esperava-se que uma criança nascida em 1960 vivesse em média 48,0 anos e, meio século depois, em 2010, este valor subiu para 73,4 anos. Além disso, uma mulher em 1960 teria em média 6,3 filhos, passando para 1,9 filhos em 2010. A diminuição da mortalidade e da fecundidade da população, fez com que as crianças sobrevivessem até idades mais avançadas<sup>20</sup>. O avanço tecnológico e científico, a melhora de condições de saúde, condições sanitárias e higiênicas que vem ocorrendo no país também possivelmente contribuíram para isso<sup>21</sup>.



Fonte: IBGE, Censo Demográfico<sup>18</sup>.

**Figura 1** – Participação dos grandes grupos de idade na população total residente Brasil – 1960/2010

Em 1960 a população com menos de 15 anos de idade representava 42,7% da população total, indo para 24,1% em 2010. A queda no nível de fecundidade diminuiu a participação da população com menos de 15 anos de idade, enquanto a diminuição na mortalidade proporcionou o aumento da participação da população mais velha<sup>20</sup>, conforme pode ser observado na **Figura 1**.

Doenças que acompanham o envelhecimento também passaram a se expressar mais no conjunto da sociedade, levando a uma maior procura dos idosos por serviços de saúde, com internações hospitalares mais frequentes e tempo de ocupação do leito maior quando se comparado a outras faixas etárias<sup>18</sup>. O crescente no número de idosos com 80 anos ou mais (idosos longevos) gera um aumento na frequência de comorbidades e declínio funcional. Doenças crônicas, constantes nesses idosos, contribuirão para o aparecimento de dificuldades nas atividades de vida diária, interferindo na independência e autonomia do idoso que tendem a necessitar de cuidados mais complexos e de longa duração<sup>22</sup>.

### 1.3 Domicílio e as Instituições de Longa Permanência para Idosos (ILPIs)

O domicílio é um espaço onde pessoas, idosas ou não, portadoras de doenças crônicas e outras afecções podem viver com boa qualidade de vida e manter estabilidade da doença. Esta é uma realidade que tem se tornado cada vez mais frequente<sup>23</sup>. Os idosos incapacitados, dependentes ou com autonomia reduzida na realização de suas atividades diárias, tem a família como alternativa de suporte sendo ela a sua principal fonte de cuidados. Entretanto existem idosos que não possuem família ou que os familiares precisam trabalhar e não podem assumir tais responsabilidades. Existem também famílias que não conseguem manter o idoso dependente em casa, pois o cuidado se tornou difícil e desgastante. Além disso, situações de conflitos familiares podem resultar na procura pela institucionalização do idoso dependente<sup>21</sup>.

As Instituições de Longa Permanência para Idosos (ILPIs), chamadas de asilos no passado, são modalidade de atendimento ao idoso fora de seu convívio familiar<sup>21</sup>. Elas oferecem cuidados para as atividades diárias como tomar banho, usar banheiro e se alimentar. Os cuidados de longa duração são principalmente destinados à população idosa, por serem mais expostos a doenças crônicas o que pode deixá-los incapacitados de realizarem tais atividades<sup>17</sup>.

O avanço da idade gera maior chance de institucionalização devido aos riscos da incapacidade funcional, maior carga de doenças crônicas e a ocorrência de internações hospitalares que potencializam essa probabilidade<sup>24</sup>. Fatores de risco para a institucionalização de idosos em ILPIs incluem: o aumento no número de idosos incapacitados e fragilizados; a falta de disponibilidade dos familiares; cuidado domiciliar de alto custo, moradias inadequadas ou que ofereçam riscos de quedas e a violência contra o idoso. Com isso as ILPI's se tornam uma alternativa que deverão ajudar a assegurar a qualidade de vida<sup>25</sup>.

Geralmente os lares de idosos admitem indivíduos que requerem um grau mais elevado de cuidados médicos e que muitas vezes precisam ser hospitalizados. Isso faz com que esses estabelecimentos possam servir como reservatório de micro-organismos multirresistente<sup>26</sup>. Uma fonte de patógenos infecciosos que pode aumentar o número de casos em hospitais de todo o país por se espalhar de estabelecimento em estabelecimento inclusive os geograficamente distantes. Determinar a origem do surgimento de um surto pode ser um desafio, pois este pode se apresentar como vários surtos em locais diferentes. Mesmo os hospitais com baixos níveis de MRSA correm risco de apresentarem surto caso os lares de idosos não mantiverem um controle de infecção eficaz<sup>27</sup>.

Avaliar o grau de resistência nos estabelecimentos para idosos se torna importante para auxiliar no controle de infecção, além de poder determinar o risco que esse micro-organismo gera para essa população.

## 2. Justificativa

A população descrita previamente apresenta grande risco de colonização e infecção por *S. aureus* necessitando assim de uma investigação mais detalhada. No Brasil há uma carência de estudos relacionados à colonização e infecção por *S. aureus* na comunidade. Nossa proposta foi contribuir para a compreensão da epidemiologia da colonização por esse micro-organismo, pois avaliamos a prevalência e fatores associados à colonização.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Determinar a prevalência e fatores associados ao carreamento nasal, oral e retal de *S. aureus* e MRSA em indivíduos acamados em domicílio ou residindo em instituições de longa permanência para idosos no município de Botucatu, SP.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificar fatores preditores do carreamento de *S. aureus* e MRSA nessas populações.
- Descrever a frequência de ocorrência dos cassetes cromossômicos *SCCmec* em MRSA.
- Descrever a distribuição clonal dos patógenos de interesse nos grupos de estudo.

#### 4. Referências

- 01 – Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Feb;46(1):8-20.
- 02 – Levine H, Kayouf R, Rozhavski V, Sela T, Rajuan-Galor I, Ferber AT, Yona S, Gorochovski O, Halperin T, Hartal M. Neglect of skin wounds and the risk of becoming a *Staphylococcus aureus* nasal carrier: a cohort study. *BMC Public Health* 2015;15:749.
- 03 – Braga ED, Aguiar-Alves F, de Freitas Mde F, et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14:538. Published 2014 Oct 6. doi:10.1186/1471-2334-14-538
- 04 – Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Sep;7(9):629-41.
- 05 – 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 Mar;38(3):1008-15.
- 06 – International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG-SCC). Acesso em: 12 de maio. 2016. Disponível em: [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_TypesEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html)
- 07 – Bonesso MF, Marques SA, Camargo CH, Fortaleza CMCB, da Cunha M de LR de S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non-outbreak skin infections. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(4):1401-1407.
- 08 – Baig S1, Johannesen TB1, Overballe-Petersen S1, Larsen J1, Larsen AR1, Stegger M2. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2018 Jul;61:74-76
- 09 – Liu PF, Cheng JS, Sy CL, Huang WC, Yang HC, Gallo RL, Huang CM, Shu CW. IsaB Inhibits Autophagic Flux to Promote Host Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol*. 2015 Nov;135(11):2714-22.
- 10 – Berglund C, Söderquist B. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Nov;14(11):1048-56.

- 11 – Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, et al. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(4):1985-1988. doi:10.1128/JCM.43.4.1985-1988.2005.
- 12 – Gelatti LC, Bonamigo RR, Inoue FM, Carmo MS, Becker AP, Castrucci FMS, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2013 Feb;46(1):34-38.
- 13 – Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, Del Peloso PF, da Costa Ferreira Leite C, Teixeira LA, Figueiredo AM. 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 Nov;59(3):339-45.
- 14 – Carmo MS, Inoue F, Andrade SS, Paschoal L, Silva FM, Oliveira VGS, et al. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2011 Oct; 44(10):1013-1017.
- 15 – Hughes CM, Smith MB, Tunney MM. Infection control strategies for preventing the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes for older people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jan 23;(1):CD006354.
- 16 – Aschbacher R, Pagani E, Confalonieri M, et al. Review on colonization of residents and staff in Italian long-term care facilities by multidrug-resistant bacteria compared with other European countries. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5:33. Published 2016 Oct 11. doi:10.1186/s13756-016-0136-1
- 17 – Camarano AA. Cuidados de longa duração para a população idosa: um novo risco social a ser assumido? Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. Rio de Janeiro, 2010.
- 18 – Veras R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. *Rev Saúde Pública* 2009;43(3):548-54.
- 19 - United Nations. *World Population Prospects: the 2015 revision*. New York: Department of Economic and Social Affairs. New York, 2015.
- 20 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo demográfico 2010*. ISSN 0104-3145 Censo demogr., Rio de Janeiro, p.1-215, 2010.
- 21 – Dias DSG, Carvalho CS, Araújo CV. Comparação da percepção subjetiva de qualidade de vida e bem-estar de idosos que vivem sozinhos, com a família e institucionalizados. *Rev. bras. geriatr. gerontol*. 2013 Mar;16(1):127-138.

- 22 - Lourenço TM, Lenardt MH, Kletemberg DF, Seima MD, Tallmann AEC, Neu DKM. Capacidade funcional no idoso longevo: uma revisão integrativa. Rev. Gaúcha Enferm. 2012 June; 33(2):176-185.
- 23 – Cattani RB, Girardon-Perlini NMO. Cuidar do idoso doente no domicílio na voz de cuidadores familiares. Revista Eletrônica de Enfermagem, v. 06, n. 02, p. 254-271, 2004. Disponível em [www.fen.ufg.br](http://www.fen.ufg.br)
- 24 – Del Duca GF, Silva SG, Thumé E, Santos IS, Hallal PC. Indicadores da institucionalização de idosos: estudo de casos e controles. Rev. Saúde Pública. 2012 Feb;46(1):147-153.
- 25 – Creutzberg M, Gonçalves LHT, Sobottka EA, Ojeda BS. A Instituição de Longa Permanência para Idosos e o sistema de saúde. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2007 Dec;15(6):1144-1149.
- 26 – Jans B, Schoevaerds D, Huang TD, Berhin C, Latour K, Bogaerts P, Nonhoff C, Denis O, Catry B, Glupczynski Y. Epidemiology of multidrug-resistant microorganisms among nursing home residents in Belgium. PLoS One. 2013 May 30;8(5):e64908.
- 27 – Lee BY, Bartsch SM, Wong KF, Singh A, Avery TR, Kim DS, Brown ST, Murphy CR, Yilmaz SL, Potter MA, Huang SS. The importance of nursing homes in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among hospitals. MedCare. 2013 Mar;51(3):205-15.

## **5. Apresentação da dissertação**

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

### **5.1 Artigo científico: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* EM PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS**

Artigo escrito segundo as normas do Periódico: *Future Microbiology* (Fator de impacto: 3,190).

## 6. Artigo

### **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* EM PACIENTES ACAMADOS EM DOMICÍLIO OU VIVENDO EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS**

Lucas Porangaba Silva\*<sup>1</sup>, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza<sup>2</sup>, Mariana Poianas Silva<sup>1</sup>, Carolina Destro de Angelis<sup>1</sup>, Patrícia Kelly Silvestre<sup>1,2</sup>, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

<sup>2</sup> Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

**\*Autor correspondente:**

Lucas Porangaba Silva

Fone: +55 14 98811 9636

E-mail: [lucas-porangaba@hotmail.com](mailto:lucas-porangaba@hotmail.com)

## Resumo

**Objetivo:** Identificar a prevalência e fatores associados ao carreamento nasal, oral e retal de *S. aureus* e MRSA em indivíduos acamados ou residindo em instituições de longa permanência para idosos (ILPIs). **Resultados:** Prevalência global de *S. aureus* de 33,6% (76) e de MRSA em 8% (8). A prevalência de *S. aureus* nas nove ILPIs estudadas variou de 16,6% a 85,7% e de MRSA de 13,3% a 25%. Residentes em ILPIs, sexo masculino, cirurgias, comorbidades *Charlson* score foram fatores de risco associados ao carreamento de *S. aureus*, enquanto que o carreamento de MRSA mostrou associação positiva com sexo masculino. **Conclusão:** Foi verificada alta prevalência de *S. aureus* em idosos de instituições de pequeno e médio porte e maior prevalência de MRSA na orofaringe.

**Palavras-chave:** população idosa, ILPIs, pacientes acamados, *Staphylococcus aureus*, MRSA, epidemiologia molecular.

**Abstract**

**Objective:** To determine the prevalence and factors associated with nasal, oral and rectal carriage of *S. aureus* and MRSA in bedridden patients and residents of long-term care facilities (LTCF) for the elderly. **Results:** The overall prevalence of *S. aureus* was 33.6% (n = 76) and that of MRSA was 8% (n = 18). In the nine LTCF studied, the prevalence ranged from 16.6% to 85.7% for *S. aureus* and from 13.3% to 25,0% for MRSA. Residency in LTCF, male gender, surgeries and comorbidities (Charlson score) were risk factors associated with *S. aureus* carriage, while MRSA carriage was positively associated with male gender. **Conclusion:** A high prevalence of *S. aureus* was observed among elderly people living in small and medium-sized institutions and the prevalence of MRSA was higher in the oropharynx.

**Keywords:** elderly population, LTCF, bedridden patients, *Staphylococcus aureus*, MRSA, molecular epidemiology

## Introdução

A epidemiologia de *Staphylococcus aureus* passou nas últimas décadas por uma revolução conceitual<sup>1</sup>. Esse fenômeno deve-se em parte a modificações relevantes do comportamento epidemiológico<sup>2</sup>. No entanto, houve também uma reavaliação de conceitos antigos em face de novos conhecimentos advindos de pesquisa clínica e experimental<sup>3</sup>.

Assim é que *S. aureus* resistentes à meticilina (*methicillin-resistant S. aureus*, MRSA), tradicionalmente abordados como agentes exclusivos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), passaram a ser reconhecidos como responsáveis por doença grave adquirida na comunidade (*Community-associated [CA]-MRSA*)<sup>4,5</sup>.

A colonização é um estágio precursor da doença invasiva. Acredita-se que carreadores de *S. aureus* apresentem maiores riscos de adquirir infecção e presume-se que os mesmos sejam uma importante fonte de disseminação da bactéria entre os indivíduos<sup>6</sup>. Estudos revelam que indivíduos colonizados com uma grande carga bacteriana apresentam risco seis vezes maior de desenvolver infecção estafilocócica, em comparação a indivíduos não-carreadores ou com baixa carga bacteriana<sup>7</sup>. Esse fenômeno parece ainda mais frequente entre os carreadores de MRSA<sup>8,9</sup>.

Uma faceta relevante da epidemiologia de *S. aureus* é o acometimento de “populações especiais”. Esse termo deve ser entendido como referindo-se a estratos populacionais diferenciados por pressões ecológicas e/ou condições de morbidade específicas, tais como idosos e acamados. A emergência de linhagens de MRSA representa risco especial para populações reconhecidamente vulneráveis como os idosos. Neste âmbito, duas situações distintas são de especial interesse: os idosos institucionalizados, vivendo em “casas de repouso”, que representam um espaço intermediário entre a comunidade e o hospital; e os idosos dependentes (acamados) cuidados em domicílio, expostos de forma intermitente aos serviços de saúde.

Sabe-se que pacientes idosos possuem um elevado risco de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas devido às comorbidades, debilidade física, cognitiva e imunidade em declínio que apresentam<sup>10</sup>. O risco é ainda maior em idosos que se encontram colonizados por *S. aureus* que podem causar infecções graves quando há comorbidades associadas (insuficiência cardíaca congestiva, diabetes, doença pulmonar e insuficiência renal)<sup>11</sup>, algo comumente encontrado em pacientes acamados cuidados em domicílio e vivendo em Instituições de Longa Permanência para Idosos - ILPIs.

Mesmo com os avanços da antibioticoterapia na diminuição da mortalidade, o prognóstico para pacientes idosos afetados por infecções com bactérias multirresistentes continua o mesmo. Acreditamos que a avaliação de grupos diferentes de idosos (acamados e institucionalizados) pode trazer *insights* sobre os fatores de risco para carreamento e disseminação de linhagens de MRSA. Uma melhor compreensão da epidemiologia e fatores de risco para a colonização por MRSA nessas populações pode ter implicações significativas para o tratamento e prevenção de infecções por MRSA.

Esse estudo se justifica pela perspectiva de que a partir dos resultados obtidos podem ser realizadas intervenções que possibilitem diminuir a disseminação de isolados resistentes de *S. aureus* entre idosos, reduzindo conseqüentemente o risco de infecções e complicações causadas pelo patógeno. Assim, estabelecer os fatores de risco e conhecer a prevalência desses microorganismos nesses ambientes se torna crucial, pois fornece suporte para decisões clínicas que visam melhorar a qualidade de vida dessa população de risco.

## **Materiais e métodos**

### **Delineamento do estudo**

O estudo foi um delineamento transversal realizado no município de Botucatu-SP, que segundo a última estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, possuía uma população estimada de 144.820 habitantes, sendo destes 17.008 idosos<sup>12</sup>.

A Secretaria Municipal da Saúde contabilizava em seu cadastro 188 residentes em Casas de Repouso e 222 acamados. Foi realizado um cálculo amostral com base nesse número onde obteve-se um “n” sugerido de 173 indivíduos. A fórmula utilizada para calcular o número de amostras está disposto no Anexo I.

Estes indivíduos foram abordados em visitas domiciliares e em instituições de longa permanência através de endereços fornecidos pela própria secretaria ou pelas unidades de saúde do município, e convidados a participar da pesquisa, após uma explicação detalhada sobre o estudo e sua importância. A participação foi confirmada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo indivíduo e nos casos de déficit cognitivo, foi solicitado o consentimento do responsável legal ou (na ausência deste) o da instituição.

Também foi aplicado questionário (Anexo 2), que incluiu dados demográficos (gênero e idade), tempo de institucionalização, dados clínicos (comorbidades), dispositivos invasivos, internações recentes (últimos 6 meses), doenças infecciosas atuais ou recentes, e uso de antimicrobianos (últimos 6 meses). Essas informações foram levantadas através de entrevista com o próprio participante e/ou seu responsável.

Foram incluídos todos os indivíduos que consentiram participar da pesquisa e nos casos dos que se encontravam impossibilitados de compreender (ex.: demência), estes foram incluídos mediante consentimento do responsável. O critério de exclusão foi indivíduos institucionalizados ou acamados há menos de 30 dias.

## **Coleta de culturas**

Amostras de vestíbulo nasal, da orofaringe e do reto de 226 indivíduos (150 residentes de nove casas de repouso e 76 acamados em domicílio) do município de Botucatu, SP, Brasil, foram coletadas utilizando um *swab* estéril com meio de transporte para cada um dos sítios citados. Devido a recusa por parte de 47 indivíduos, somente 179 *swabs* retais foram coletados. Já para os sítios nasal e oral não houve nenhuma recusa entre os 226 indivíduos incluídos no estudo.

A técnica de coleta incluiu a umidificação do *swab* em solução fisiológica 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas as narinas, até a maior profundidade tolerável pelo participante da pesquisa, com rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. Para coleta da orofaringe o *swab* foi levemente pressionado e girado sobre as tonsilas e atrás da úvula (faringe posterior), evitando-se tocar na língua, mucosa bucal e úvula. Já para a coleta retal passou-se a ponta do *swab* a aproximadamente dois centímetros do esfíncter anal, rotacionando cuidadosamente para coletar amostra das criptas anais, certificando-se de que houvesse coloração fecal no algodão após a retirada do *swab*. Após a coleta, os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

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

As amostras coletadas dos três sítios foram semeadas em placas de petri contendo ágar Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 48 horas as culturas que se desenvolveram foram submetidas à coloração de Gram objetivando-se sua pureza e a observação da morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram feitas as provas de catalase e coagulase em tubo conforme preconizado por Koneman *et al*<sup>13</sup> e provas bioquímicas adicionais de fermentação dos açúcares maltose, trealose e manitol.

## **Extração de DNA**

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10mg/ml) e proteinase K (20mg/ml). Após isso, 500µl da solução de extração foi adicionada à mistura e centrifugado a 10.000 x g por quatro min. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 x g por um min. O líquido coletado foi descartado e 500µl de solução de extração foi adicionada novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500µl da solução de lavagem foi adicionado à coluna e submetido à centrifugação a 20.000 x g por três min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5ml e 200µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição.

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

As amostras foram submetidas à técnica de PCR para amplificação do fragmento de DNA *Sa442*, específico da espécie *S. aureus* seguindo o protocolo descrito por Martineau *et al*<sup>14</sup>, na qual foram utilizados os primers *Sa442-1* (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3') e *Sa442-2* (5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3') gerando um produto amplificado de 241pb.

### **Testes de suscetibilidade antimicrobiana**

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados através da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*<sup>15</sup>. Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 18 a 24 horas e ajustadas em salina com a turbidez da escala 0.5 de Macfarland. As drogas utilizadas foram: Oxacilina (1µg) e Cefoxitina (30µg). Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita com utilização de swab estéril na superfície de Ágar Mueller Hinton, onde posteriormente foram aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI. A linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi a utilizada como controle durante o teste.

### **Detecção molecular do gene *mecA* e caracterização do SCC*mec*.**

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA*, gene de resistência à meticilina, foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami *et al*<sup>16</sup>, utilizando os primers *mecA1* e *mecA2*. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% corado com *Saber Safe*.

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se um método de reação PCR-Multiplex, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>17</sup> e atualizado por Milheiriço *et al*<sup>18</sup>.

## PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

Todos os isolados de MRSA obtidos no estudo foram submetidos à tipagem molecular pela técnica de *Pulsed-Field Gel Eletroforesis* (PFGE), conforme protocolo modificado de McDougal *et al*<sup>19</sup>.

Os isolados de MRSA 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 *lowmelt*.

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 1,2% e 1%, respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq$ 80% foi escolhido para determinação dos *clusters*.

Os isolados de MRSA que não puderam ser tipados após digestão com a enzima *SmaI* foram tipados utilizando a enzima de restrição *ApaI*.

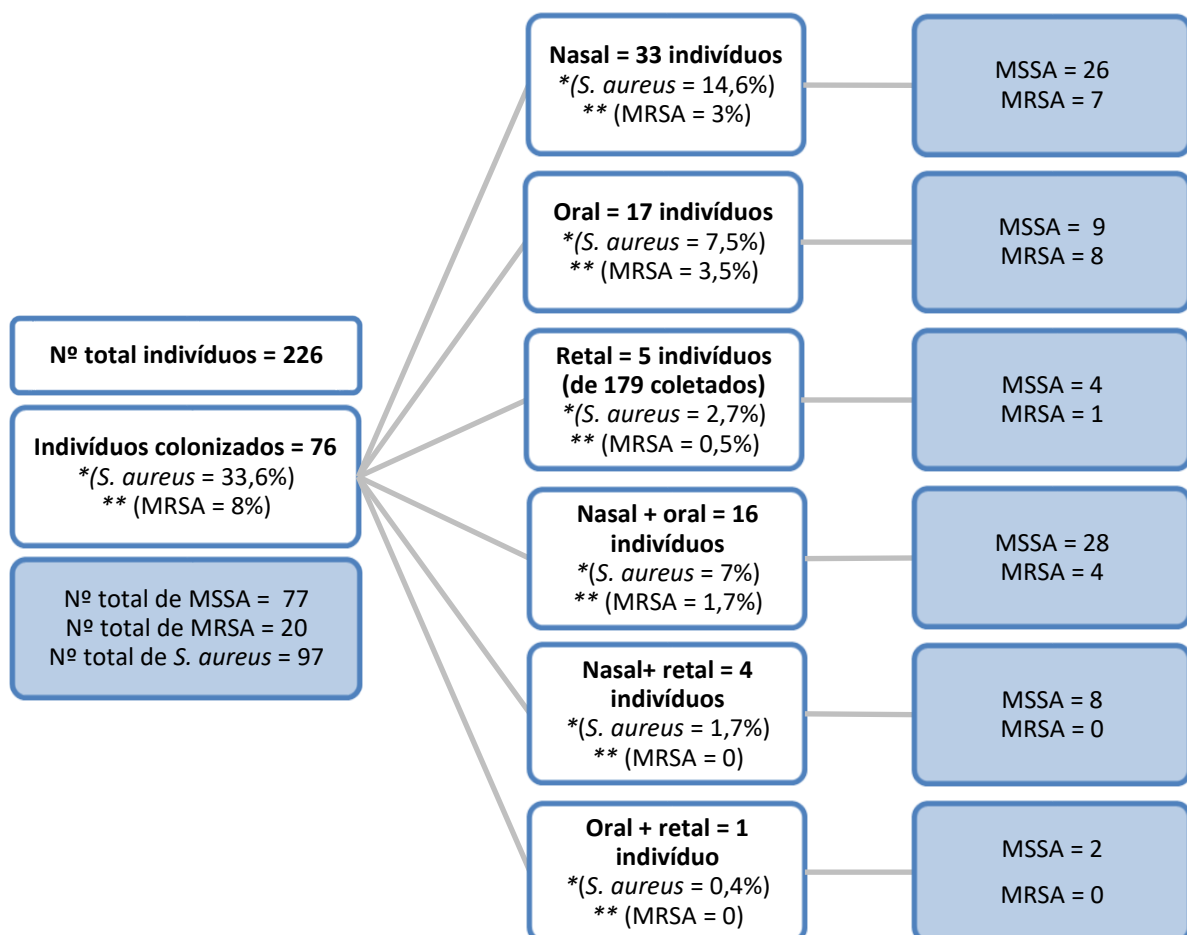
## **Análise estatística**

O delineamento do estudo é transversal e considerou como desfecho a presença de *S. aureus* ou MRSA. Para identificação dos fatores de risco, foi realizada inicialmente análise univariada. Variáveis dicotômicas foram analisadas pelos testes do Chi-quadrado ou Exato de Fisher (quando pertinente). Variáveis numéricas foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney. A seguir, testamos os confundimentos em modelos multivariados de Regressão Logística, utilizando uma estratégia de seleção de variáveis por avanços (stepwise forward) com critério de *p*-valor menor que 0,1 para entrada e permanência nos modelos. Os dados foram armazenados no software EPI INFO 7 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) e todas as análises foram realizadas em SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, USA).

## Resultados

### Prevalência da colonização de *S. aureus* e MRSA

Amostras de 226 indivíduos foram coletadas e analisadas. A prevalência global identificou 33,6% (76) como sendo portadores de *S. aureus* e 8% (18) de MRSA, em pelo menos um dos sítios coletados. Quanto à prevalência por sítio, foi verificado na cavidade nasal um total de 53 *S. aureus* sendo 33(14,6%) exclusivos deste sítio. Já de origem oral foi verificado um total de 34 *S. aureus* sendo 17 (7,5%) exclusivos deste sítio. Na cavidade retal o total de *S. aureus* foi de 10 sendo cinco (2,2%) exclusivos deste sítio. Além disso foi observado portadores simultaneamente nasal e oral em 16 (7%), concomitantemente nasal e retal em quatro (1,7%) e simultaneamente oral e retal em um (0,4%) dos indivíduos. Quanto aos 20 MRSA identificados, sete foram de origem nasal, oito da orofaringe, um retal e quatro simultaneamente de origem nasal e oral (Figura 2). Vale ressaltar que, em um indivíduo do estudo foi encontrado MSSA nasal e MRSA oral e em outro indivíduo foi encontrado MRSA nasal e MSSA retal.



**Figura 2** – Fluxograma do número total de indivíduos colonizados por *S. aureus* e análise do número de indivíduos colonizados por MSSA e MRSA de acordo com sítio de coleta

**Nota.** Número total de indivíduos incluídos no estudo (226), colonizados com *S. aureus* (76) e por sítio de coleta.

\*Prevalência global de *S. aureus*. \*\* Prevalência global de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina - MRSA.

Dentre os 226 indivíduos, 150 tiveram origem de nove instituições de longa permanência distintas. Essas unidades possuíam portes variados de residentes sendo que a maior abrigava 60 idosos e a menor seis residentes. A **Tabela 2** mostra a relação de residentes por ILPI, as quais foram designadas de A a I.

**Tabela2**– Prevalência de *S. aureus* e MRSA das ILPI's

Prevalência	ILPI's																		
	A (N=7)		B (N=6)		C (N=12)		D (N=6)		E (N=7)		F (N=18)		G (N=60)		H (N=16)		I (N=18)		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>Total</b>	<i>S. aureus</i>	6	85,7	3	50,0	7	58,3	2	33,3	3	42,9	5	27,7	20	33,3	8	50,0	3	16,6
	MRSA	1	14,3	1	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	8	13,3	4	25,0	0	0
<b>Nasal</b>	<i>S. aureus</i>	4	57,1	1	16,7	1	8,3	2	33,3	0	0	2	11,1	12	20,0	3	18,7	2	11,1
	MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6,6	2	12,5	0	0
<b>Oral</b>	<i>S. aureus</i>	1	14,3	1	16,7	3	25,0	0	0	1	14,3	0	0	3	5,0	3	18,7	1	5,5
	MRSA	1	14,3	1	16,7	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5,0	2	12,5	0	0
<b>Retal</b>	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14,3	2	11,1	0	0	0	0	0	0
	MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Nasal + Oral</b>	<i>S. aureus</i>	1	14,3	1	16,7	2	16,7	0	0	0	0	1	5,5	3	5,0	2	12,5	0	0
	MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,6	0	0	0	0
<b>Nasal + Retal</b>	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	1	8,3	0	0	0	0	0	0	2	3,3	0	0	0	0
	MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Oral + Retal</b>	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14,3	0	0	0	0	0	0	0	0
	MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nota:** Prevalência de *S. aureus* e MRSA das nove Instituições de Longa Permanência para Idosos – ILPI's envolvidas no estudo, denominadas de A-H. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina - MRSA.

A prevalência de *S. aureus* de cada ILPI foi de 85,7% (A), 50,0% (B), 58,3% (C), 33,3% (D), 42,9% (E), 27,7% (F), 33,3% (G), 50,0% (H) e 16,6% (I). Apenas quatro das nove instituições apresentaram residentes colonizados por MRSA, com prevalência de 14,3% (A), 16,7% (B), 13,3% (G) e 25% (H). Algumas das instituições de pequeno porte apresentaram as prevalências de *S. aureus* mais elevadas quando comparadas às outras ILPI's.

Dos 76 indivíduos acamados coletados 20 (26,3%) estavam colonizados por *S.aureus*. Desses, quatro (5,2%) eram MRSA, sendo três habitantes de um mesmo bairro enquanto um habitava o bairro vizinho.

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

A análise dos 97 isolados de *S. aureus* pelo método de disco difusão revelou que 11 se mostraram resistentes à oxacilina e à cefoxitina simultaneamente, cinco resistentes somente à oxacilina e dois resistentes somente à cefoxitina, resultando em um total de 18 isolados apresentando resistência fenotípica.

Importante notar que três das amostras que foram resistentes somente à oxacilina não possuíam o gene *mecA*. Além disso, verificamos também que cinco amostras que se mostraram sensíveis fenotipicamente às duas drogas possuíam o gene *mecA*. Houve também duas amostras resistentes à cefoxitina e que possuíam o *mecA*, mas se mostraram sensíveis à oxacilina. Os resultados foram obtidos seguindo os critérios recomendados pelo CLSI considerando como resistência halo $\leq$ 10 (oxacilina) e  $\leq$ 21(cefoxitina) e estão descritos na **Tabela 3**.

**Tabela 3**– Perfil de sensibilidade dos isolados de MSSA e MRSA frente aos antimicrobianos

<i>S. aureus</i>	Gene <i>mecA</i>	Oxacilina		Cefoxitina	
		R	S	R	S
MSSA (77)	0	3	74	0	77
MRSA (20)	20	13	7	13	7
<b>Total (97)</b>	20	<b>16</b>	81	<b>13</b>	84

**Nota.** Isolados identificados como *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à metilina, MSSA e MRSA respectivamente, a partir da presença do gene *mecA*. R=resistente. S=sensível.

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

O gene *mecA* foi identificado em *S. aureus* isolados de 18 indivíduos, mas totalizando 20 amostras visto que dois indivíduos apresentaram isolados resistentes em mais de um sítio de coleta. Assim, das 20 amostras resistentes, sete foram de origem nasal, oito da orofaringe, uma retal e quatro simultaneamente nasal e oral.

Dentre as 20 amostras positivas para o gene *mecA*, seis carregavam o SCC*mec* do tipo IV (CA-MRSA), nove isolados como SCC*mec* do tipo II (HA-MRSA) e um isolado como SCC*mec* tipo I (HA-MRSA). Os demais não foram tipados pela técnica de Milheiro *et al*<sup>10</sup>.

É importante destacar que todos os seis SCC*mec* do tipo IV encontrados no estudo tiveram origem de indivíduos de instituição de longa permanência. Já os nove SCC*mec* tipo II foram encontrados em três indivíduos acamados e seis de instituição de longa permanência. Já o único SCC*mec* tipo I foi encontrado em indivíduo acamado em domicílio.

## Fatores de risco para carregamento de MRSA

Os resultados da análise univariada e multivariada (modelo de regressão logística) realizada para determinação dos fatores de risco para carregamento de *S. aureus* e MRSA estão descritos nas **Tabelas 4 e 5**.

Para o carregamento de *S. aureus* foi verificada uma associação positiva ligada ao tempo sob risco (meses de restrição ao leito ou institucionalização) somente na análise univariada com  $p=0,003$ . Na análise multivariada houve associação positiva para residentes em instituições de longa permanência (OR=2,05, IC95%=1,07-3,91,  $p=0,03$ ), histórico de cirurgias no último ano (OR=5,99, IC95%=1,26-28,92,  $p=0,02$ ), presença de comorbidades pelo índice de *Charlson* (OR=1,35, IC95%=1,01-1,92,  $p=0,047$ ) e associação negativa com doença cardíaca (OR=0,18, IC95%=0,05-0,70,  $p=0,01$ ). O sexo masculino mostrou associação positiva tanto na análise univariada (OR=2,15, IC95%=1,22-3,79,  $p=0,008$ ) quanto na multivariada (OR=2,59, IC95%=1,41-4,76,  $p=0,002$ ).

Para o carregamento de MRSA a análise univariada (OR=2,96, IC95%=1,103-7,98,  $p=0,03$ ) e multivariada (OR=3,29, IC95%=1,18-9,17,  $p=0,02$ ) revelaram associação positiva como sexo masculino.

**Tabela 4**– Análise uni e multivariada (modelo de regressão logística) para preditores de carreamento de *S. aureus*.

Fatores de Risco	Análise Univariada				Análise Multivariada	
	<i>S. aureus</i> (76)	Negativos (150)	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
<i>Dados demográficos</i>						
<b>Sexo masculino</b>	<b>37 (48,7)</b>	<b>48 (30,7)</b>	<b>2,15 (1,22-3,79)</b>	<b>0,008</b>	<b>2,59 (1,41-4,76)</b>	<b>0,002</b>
Idade[anos], mediana (quartis)	77,5 (70-84)	80 (70-85)	...	0,41		
<b>Instituição de longa permanência Tempo sob risco*[meses], mediana (quartis)</b>	56 (73,7)	94 (62,7)	1,6 (0,908-3,065)	0,98	<b>2,05 (1,07-3,91)</b>	<b>0,03</b>
	<b>36 (12-66)</b>	<b>66 (24-66)</b>	...	<b>0,003</b>		
<i>Comorbidades</i>						
<b>Doença Cardíaca</b>	3 (3,9)	17 (11,3)	0,32 (0,01-1,13)	0,07	<b>0,18 (0,05-0,70)</b>	<b>0,01</b>
Doença Pulmonar	5 (6,6)	8 (5,3)	1,25 (0,40-3,96)	0,77		
Doença Renal	4 (5,3)	3 (2,0)	2,72 (0,59-12,48)	0,22		
Doença Hepática	0 (0,0)	2 (1,3)	0,00 (... - ...)	0,55		
Diabetes Mellitus	19 (25,0)	29 (19,3)	1,39 (0,72-2,68)	0,32		
Doença do Sistema Nervoso Central	20 (26,3)	33 (22,0)	1,26 (0,66-2,40)	0,46		
Neoplasia	6 (7,9)	6 (4,0)	2,057 (0,64-6,60)	0,21		
Aids	0 (0,0)	1 (0,7)	0,00 (...-...)	1,00		
Úlceras de pressão	6 (7,9)	9 (6,0)	1,34 (0,46-3,92)	0,58		
<b>Índice de Charlson, mediana (quartis)</b>	1 (1-1)	1 (0-1)	...	0,25	<b>1,35 (1,01-1,92)</b>	<b>0,047</b>
<i>Procedimentos</i>						
Internação em hospital**	14 (18,4)	19 (12,7)	1,55 (0,73-3,30)	0,24		
<b>Cirurgia**</b>	6 (7,9)	3 (2,0)	4,20 (1,020-17,28)	0,064	<b>5,99 (1,26-28,92)</b>	<b>0,02</b>
Outros procedimentos invasivos**	4 (5,3)	7 (4,7)	1,13 (0,32-4,004)	1,00		
<i>Uso de antimicrobianos**</i>	10 (13,2)	9 (6,0)	2,37 (0,92-6,11)	0,67		

**Nota:** Os dados estão em porcentagem exceto quando especificado. Resultados significantes são mostrados em negrito. OR= Odds ratio. IC=Intervalo de confiança. \* Tempo de internação em instituição de longa permanência ou restrição ao leito. \*\* Nos últimos 6 meses.

**Tabela 5**– Análise uni e multivariada (modelo de regressão logística) para preditores de carreamento de MRSA.

Fatores de Risco	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	MRSA (18)	Negativos (208)	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
<i>Dados demográficos</i>						
<b>Sexo masculino</b>	<b>11 (61,1)</b>	<b>72 (34,6)</b>	<b>2,96 (1,103-7,98)</b>	<b>0,03</b>	<b>3,29 (1,18-9,17)</b>	<b>0,02</b>
Idade[anos], mediana (quartis)	76 (69,5-83)	77 (60-85)	...	0,51		
Instituição de longa permanência	14 (77,8)	136 (65,4)	1,85 (0,58-5,83)	0,28		
Tempo sob risco*[meses], mediana (quartis)	36 (18-67,5)	60 (18-66)		0,61		
<i>Comorbidades</i>						
Doença Cardíaca	2 (11,1)	18 (8,7)	1,31 (0,28-6,20)	0,66		
Doença Pulmonar	2 (11,1)	11 (5,3)	2,39 (0,45-10,98)	0,27		
Doença Renal	1 (5,6)	6 (2,9)	1,98 (0,22-17,41)	0,44		
Doença Hepática	0 (0,0)	2 (1,0)	0,00 (...-...)	1,00		
Diabetes Mellitus	1 (5,6)	47 (22,6)	0,20 (0,26-1,55)	0,13		
Doença do Sistema Nervoso Central	5 (27,8)	48 (23,1)	1,28 (0,43-3,77)	0,77		
Neoplasia	1 (5,6)	11 (5,3)	1,053 (0,12-8,65)	1,00		
Aids	0 (0,0)	1 (0,5)	0,00 (...-...)	1,00		
Úlceras de pressão	3 (16,7)	12 (5,8)	3,26 (0,83-12,85)	0,10		
Índice de Charlson, mediana (quartis)	1 (1-1,5)	1 (0-1)	...	0,91		
<i>Procedimentos</i>						
Internação em hospital**	4 (22,2)	29 (13,9)	1,76 (0,54-5,73)	0,30		
Cirurgia**	1 (5,6)	8 (3,8)	1,47 (0,17-12,46)	0,53		
Outros procedimentos invasivos**	1 (5,6)	10 (4,8)	1,16 (0,14-9,65)	1,00		
<i>Uso de antimicrobianos**</i>	2 (11,1)	17 (8,2)	1,40 (0,29-6,62)	0,65		

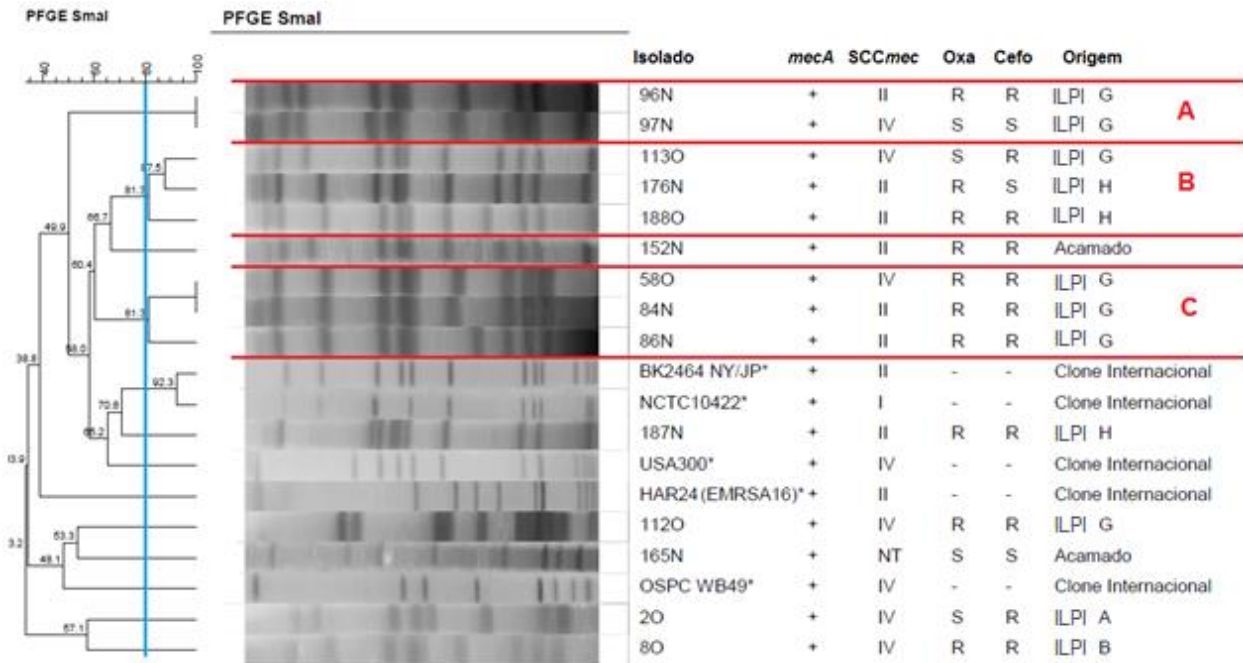
**Nota:** Os dados estão em porcentagem exceto quando especificado. Resultados significantes são mostrados em negrito. OR= Odds ratio. IC=Intervalo de confiança. \* Tempo de internação em instituição de longa permanência ou restrição ao leito. \*\* Nos últimos 6 meses.

### **Determinação do perfil clonal dos isolados de MRSA por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)**

Os 20 isolados positivos para o gene *mecA* foram analisados pela técnica de PFGE. Através da análise do dendrograma foi possível identificar a presença de clusters com similaridade  $\geq 80\%$  (**Figuras 3 e 4**).

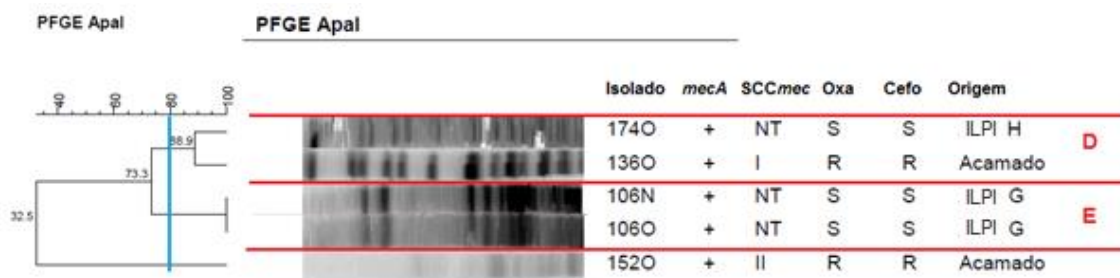
Na **Figura 3** é possível verificar a presença de três clusters tipados após digestão com a enzima *SmaI*. O cluster **A** agrupou dois isolados de indivíduos diferentes (96N e 97N), mas provenientes da mesma ILPI. O cluster **B** apresentou três isolados de indivíduos diferentes (113O, 176N e 188O) sendo um deles residente em ILPI diferente. Já o cluster **C** também agrupou três isolados de indivíduos diferentes (58O, 84N e 86N) todos provenientes da mesma ILPI. Um dos isolados (187N) de ILPI apresentou 70,8% de similaridade com um clone internacional de MRSA.

Os seis MRSA que não foram digeridos com a enzima *SmaI* foram submetidos à tipagem por PFGE com a enzima de restrição *ApaI* (**Figura 4**). A análise do dendrograma revela a formação de dois clusters tipados com *ApaI*. O cluster **D** agrupou isolados de 2 indivíduos (174O e 136O), sendo um MRSA isolado de residente de ILPI e outro isolado de indivíduo acamado em domicílio. Já o cluster **E** agrupou dois isolados (106N e 106O) de sítios diferentes de um mesmo indivíduo institucionalizado. É importante destacar que na ILPI G foram encontrados quatro dos cinco clusters identificados no estudo.



**Figura 3:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE + *SmaI* de isolados de MRSA provenientes de indivíduos acamados em domicílio ou de Instituição de Longa Permanência.

**Nota:** N=mucosa nasal. O=mucosa orofaríngea. NT=não tipado. Oxa=oxacilina. Cefo=cefotetina. S=sensível. R=resistente. ILPI=instituição de longa permanência para idoso.



**Figura 4:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE + *ApaI* de isolados de MRSA provenientes de indivíduos acamados em domicílio ou de Instituição de Longa Permanência.

**Nota:** N=mucosa nasal. O=mucosa orofaríngea. NT=não tipado. Oxa=oxacilina. Cefo=cefotetina. S=sensível. R=resistente. ILPI=instituição de longa permanência para idoso.

## Discussão

O patógeno bacteriano mais comum isolado em humanos é o *Staphylococcus aureus* sendo responsável por infecções leves, como de pele e tecidos moles e também doenças graves e invasivas, como pneumonia, endocardite e sepse. Sua prevalência geral no mundo está estimada entre 20 a 40% sendo a colonização prévia um fator de risco para a posterior infecção por esse micro-organismo<sup>20</sup>.

Um estudo multicêntrico que investigou idosos residentes em casa de repouso na França encontrou prevalência de *S. aureus* de 27,6% e MRSA de 8,7%<sup>21</sup>. Outro estudo multicêntrico, também realizado com indivíduos residentes em casas de repouso na Alemanha identificou *S. aureus* como agente patogênico mais prevalente, com taxas de 29,5% de *S. aureus* e 1,1% de MRSA<sup>22</sup>.

O presente estudo encontrou em indivíduos acamados em domicílio e residentes de instituições de longa permanência, uma prevalência de *S. aureus* de 33,6% e MRSA de 8%, valores próximos aos encontrados na literatura internacional. Porém, quando comparado a dados nacionais a prevalência obtida se mostra maior. Em um estudo realizado no município vizinho, com 94 km de distância, que utilizou a mesma metodologia, Silveira *et al*<sup>23</sup> verificaram taxas de colonização por *S. aureus* e MRSA de 17,7% e 3,7%, respectivamente, em idosos vivendo em casas de repouso.

Os resultados de prevalência obtidos no estudo para a colonização por *S. aureus* foram similares aos encontrados em estudo de base populacional realizado por Pires *et al*<sup>24</sup> em indivíduos de várias faixas etárias do mesmo município (prevalência de *S. aureus* de 32,7%), porém com prevalência superior à de MRSA (0,9%).

As prevalências de *S. aureus* e MRSA nas ILPIs podem variar conforme o número de residentes que abrigam. As ILPI's de pequeno porte (A, sete idosos) e (B, seis idosos) mostraram taxas de MRSA de 14,3% e 16,7%, respectivamente. Valores próximos aos da ILPI (G), de grande porte (60 residentes), que mostrou taxa de 13,3%. Porém, a ILPI (H), de médio porte (16 idosos), foi a que mostrou a maior prevalência de MRSA (25,0%). Silveira *et al*<sup>23</sup> encontraram resultado similar, com prevalência maior de *S. aureus* e MRSA nas instituições de pequeno e médio porte.

Embora a nasofaringe seja o local mais consistente de colonização por *S. aureus*, sendo indicada como o ambiente mais apropriado para *screening* com *swabs*, outros sítios (extra nasais) também podem ser colonizados. Estudos recentes têm demonstrado que um número substancial de indivíduos, variando de 7% a 32% são carreadores de *S. aureus* exclusivamente na orofaringe,

sugerindo que a inclusão de um esfregaço da garganta, além de um swab nasal pode desempenhar um papel importante no sucesso de programas de vigilância<sup>25</sup>.

Além disso, dentre os 20 MRSA isolados no estudo, oito deles eram de origem exclusivamente oral e um exclusivamente retal, o que ressalta a importância do papel de sítios extra nasais na epidemiologia por esse micro-organismo, sítios que costumam ser negligenciados e que podem contribuir na disseminação do patógeno<sup>26</sup>. Quase metade (45%) dos MRSA teriam sido perdidos caso as coletas dos outros sítios não tivessem sido realizadas. Isso também foi observado em outros trabalhos onde Srinivasan *et al*<sup>27</sup> relatam 28% de MRSA que se perderiam se não fosse pela coleta dos sítios extra nasais. A presença de MRSA nesses sítios também indica grande carga e risco de disseminação do patógeno, com risco significativamente maior de infecção quando há a colonização em diferentes sítios simultaneamente<sup>27</sup>.

Todos os SCCmec do tipo IV foram isolados de residentes institucionalizados, sendo consideradas cepas originalmente comunitárias. O tipo II, o mais encontrado no estudo, foi isolado de residentes de ILPIs e de indivíduos acamados em domicílio. Já o tipo I foi encontrado somente em um indivíduo acamado. Os achados corroboram com o estudo de Silveira *et al*<sup>23</sup>, que encontraram mais SCCmec tipo II (6), fato atribuído ao histórico de internação hospitalar prévia, visto que tanto o tipo II quanto tipo I se caracteriza como sendo típico de hospitais.

Vale ressaltar que os indivíduos acamados em domicílio, devido a sua dificuldade de locomoção, recebem visitas esporádicas de agentes de saúde o que pode facilitar o transporte desses micro-organismos. Até mesmo algumas instituições de longa permanência contam com profissionais da saúde à disposição. Logo, essa população representa um espaço intermediário entre os dois ambientes (comunitário e hospitalar), influenciando diretamente a dinâmica epidemiológica de *S. aureus* e MRSA.

A análise dos fatores de risco para colonização por *S. aureus* revelou associação positiva para a institucionalização no modelo de regressão logística. Idosos institucionalizados vivem em ambiente confinado, muitas vezes compartilhando objetos com vários residentes, o que facilita a transmissão cruzada nesses locais, além do frequente comprometimento cognitivo desses indivíduos, que reduz a adesão a medidas de higiene básica<sup>28</sup>. Associação positiva de carreamento de *S. aureus* também foi verificada com scores mais altos da mediana do índice de comorbidades de Charlson, o que está de acordo com a literatura, já que a presença de maior número de comorbidades eleva o risco de colonização<sup>11</sup>.

O histórico prévio de cirurgias também apresentou associação positiva com o carreamento de *S. aureus*, enquanto doença cardíaca apresentou associação negativa. Esses resultados contrastam com os dados encontrados por Silveira *et al*<sup>23</sup> que não verificaram associação com essas comorbidades.

O sexo masculino mostrou associação positiva para o carreamento de *S. aureus* e também foi a única variável que mostrou associação positiva para o carreamento de MRSA. Nillius *et al*<sup>29</sup> relataram que residentes de ILPIs do sexo masculino apresentaram um risco quase duplo para o transporte de MRSA quando comparado com as mulheres, provavelmente por apresentarem mais fatores de risco do que elas<sup>29</sup>.

Quanto à tipagem de MRSA por PFGE foi possível verificar a formação de cinco clusters sendo quatro desses agrupando isolados de MRSA da ILPI com maior número de residentes, e também como maior número de isolados MRSA, com 9 (45%) dos 20 MRSA encontrados no estudo. Estudos demonstram que a equipe de enfermagem tem um risco aumentado de colonização por MRSA<sup>30</sup>. Este fato pode também contribuir para a transmissão cruzada verificada dentro desta instituição, visto que ela contava com um maior grupo de profissionais para cuidar de seus residentes institucionalizados. Os resultados do PFGE também mostraram a formação de um *Cluster* com MRSA dessa ILPI com MRSA de outra ILPI de médio porte indicando disseminação de MRSA entre diferentes instituições. Silveira *et al*<sup>23</sup> também encontraram que dos três clusters identificados em seu estudo, havia indicação de disseminação entre as ILPI's.

Em relação aos 76 indivíduos acamados em domicílio, foi observado que 20 (26,3%) estavam colonizados por *S. aureus*. Desses, quatro (5,2%) eram MRSA, sendo três provenientes de habitantes de um mesmo bairro e o outro de bairro vizinho próximo. A tipagem dos MRSA mostraram similaridade entre um MRSA isolado de acamado e de MRSA isolado da ILPI de médio porte. A disseminação de clones bem-sucedidos na comunidade é um fato que exige atenção pois coloca a população sob risco aumentado de infecção. Os diversos reservatórios disponíveis na comunidade facilitam o transporte de cepas endêmicas para dentro dos domicílios<sup>31</sup>.

## **Conclusão**

Com os dados obtidos é possível compreender melhor a epidemiologia de *S. aureus* e MRSA ajudando a conhecer os fatores de risco da população estudada para o carreamento desses micro-organismos. Os resultados descritos ressaltam o papel que as instituições de pequeno porte e médio porte desempenham pela alta prevalência de MRSA que possuem. Isso coloca seus residentes a elevado grau de risco de comorbidades e mortalidade. Intervenções nesses ambientes podem vir a melhorar a qualidade de vida da população e ajudar a controlar a disseminação desses patógenos dentro da comunidade. Além disso, os achados de MRSA mostram a importância de se avaliar sítios extra nasais geralmente negligenciados.

## Referências

1. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001;7:178-82.
2. Klein EY, Sun L, Smith DL, Laxminarayan R. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a national observational study. Am J Epidemiol. 2013;177:666-74.
3. Nimmo GR, Bergh H, Nakos J, Whitley D, Marquess J, Huygens F, Paterson DL. Replacement of healthcare-associated MRSA by community-associated MRSA in Queensland: confirmation by genotyping. J Infect. 2013;67:439-47.
4. Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? Int J Med Microbiol. 2013;303:324-30.
5. Cataldo MA, Taglietti F, Petrosillo N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a community health threat. Postgrad Med. 2010;122:16-23.
6. Lo WT, Wang CC, Lin WJ, Wang SR, Teng CS, Huang CF, Chen SJ. Changes in the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004-2009. PLoS One. 2010;5:e15791.
7. Tong SY, Chen LF, Fowler VG Jr. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? Semin Immunopathol. 2012;34:185-200.
8. Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. Am J Med. 2008;121:310-5.
9. Pimenta Rodrigues MV, Fortaleza CM, Souza CS, Teixeira NB, Cunha ML. Genetic Determinants of Methicillin Resistance and Virulence among *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Clinical and Surveillance Cultures in a Brazilian Teaching Hospital. IRSN Microbiology 2012; 975143.
10. Rebelo M, Pereira B, Lima J, Decq-Mota J, Vieira JD, Costa JN. Predictors of in-hospital mortality in elderly patients with bacteraemia admitted to an Internal Medicine ward. Int Arch Med. 2011;4(1):33. Published 2011 Oct 4. doi:10.1186/1755-7682-4-33
11. Bierowiec K, Płoneczka-Janeczko K, Rypuła K. Is the Colonisation of *Staphylococcus aureus* in Pets Associated with Their Close Contact with Owners? PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156052.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010. ISSN 0104-3145 Censo demogr., Rio de Janeiro, p.1-215, 2010
13. 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.

14. 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.
15. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Twenty six Edition (M100S). CLSI, 2016.
16. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2240-44.
17. 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.
18. 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
19. 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.
20. Braga ED, Aguiar-Alves F, de Freitas Mde F, et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. BMC Infect Dis. 2014;14:538. Published 2014 Oct 6. doi:10.1186/1471-2334-14-538
21. Rondeau C, Chevet G, Blanc DS, et al. Current Molecular Epidemiology of MethicillinResistant *Staphylococcus aureus* in Elderly French People: Troublesome Clones on the Horizon. Front Microbiol. 2016;7:31. Published 2016 Jan 28. doi:10.3389/fmicb.2016.00031
22. Kwetkat A, Pfister W, Pansow D, Pletz MW, Sieber CC, Hoyer H. Naso- and oropharyngeal bacterial carriage in nursing home residents: Impact of multimorbidity and functional impairment. PLoSOne. 2018;13(1):e0190716. Published 2018 Jan 5. doi:10.1371/journal.pone.0190716.
23. Silveira M, Cunha MLRS, Souza CSM, Correa AAF, Fortaleza CMCB. Nasal colonization with methicillinresistant *Staphylococcus aureus* among elderly living in nursing homes in Brazil: risk factors and molecular epidemiology. Ann ClinMicrobiolAntimicrob (2018) 17:18
24. Pires FV, Cunha MLRS, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CM. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. PLoS One. 2014;9:e92537.
25. Smith TC, Forshey BM, Hanson BM, Wardyn SE, Moritz ED. Molecular and epidemiologic predictors of *Staphylococcus aureus* colonization site in a population with limited nosocomial exposure. Am J Infect Control. 2012;40:992-6.

26. 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):17015.
27. Srinivasan A, Seifried SE, Zhu L, et al. Increasing prevalence of nasal and rectal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(7):1317-22.
28. Aschbacher R, Pagani E, Confalonieri M, et al. Review on colonization of residents and staff in Italian long-term care facilities by multidrug-resistant bacteria compared with other European countries. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5:33. Published 2016 Oct 11. doi:10.1186/s13756-016-0136-1
29. Nillius D, von Müller L, Wagenpfeil S, Klein R, Herrmann M. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Saarland, Germany: The Long-Term Care Facility Study. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153030. Published 2016 Apr 13. doi:10.1371/journal.pone.0153030
30. Dulon M, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA carriage among healthcare workers in non-outbreak settings in Europe and the United States: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2014;14:363. Published 2014 Jul 3. doi:10.1186/1471-2334-14-363.
31. Knox J, Uhlemann AC, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends Microbiol.* 2015;23(7):437-44

## 7. Conclusões

- A prevalência de *S. aureus* e MRSA foi maior do que outros estudos nacionais;
- Instituições de pequeno e médio porte se mostraram mais prevalentes para *S. aureus* e MRSA;
- A institucionalização, tempo de risco, histórico de cirurgia, comorbidades, e sexo masculino foram fatores de risco para carreamento de *S. aureus* na população estudada;
- Sexo masculino foi fator de risco para carreamento de MRSA;
- *S. aureus* SCCmec Tipo II foi o mais encontrado na população estudada, com o SCCmec Tipo IV identificado somente nos MRSA isolados de indivíduos institucionalizados.

## 8. ANEXO 1

Foi selecionada amostra representativa, baseada nos seguintes parâmetros:

- Tamanho da população (para o fator de correção da população finita ou fcp) ( $N$ ): 350
- Frequência % hipotética do fator do resultado na população ( $p$ ): 33% +/- 5
- Limites de confiança como % de 100 (absoluto +/- %) ( $d$ ): 5%
- Efeito de desenho (para inquéritos em grupo-EDFF): 1
- Equação:  $n = [EDFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$
- Tamanho da amostra (Intervalo de confiança 95%): 173

## 9. ANEXO 2

### QUESTIONÁRIO

Nome: \_\_\_\_\_ Gênero: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Casa de Repouso (S/N): \_\_\_\_\_

Tempo de institucionalização (meses): \_\_\_\_\_ Tempo de restrição ao leito (meses): \_\_\_\_\_

#### Co-morbidades/Charlson score

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

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

3 - ( ) Doença hepática moderada/severa

4 - ( ) AIDS ( ) Tumor sólido metastático

Score de Charlson: \_\_\_\_\_

Outras co-morbidades: \_\_\_\_\_ Demência senil? (S/N): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Karnofsky: \_\_\_\_\_

#### Internações em hospitais no último ano:

Hospital	Data Entrada	Data Saída	Motivo

**Uso de antimicrobianos no último ano**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Data início</b>	<b>Data fim</b>	<b>Motivo</b>

**Cirurgias e procedimentos invasivos no último ano**

<b>Procedimento</b>	<b>Data</b>	<b>Motivo</b>

**Outras informações de interesse:**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---