

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Departamento de Doenças Tropicais**

**Epidemiologia molecular e fatores de risco para aquisição de clones endêmicos de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) em um hospital de ensino.**

**MARCUS VINICIUS PIMENTA RODRIGUES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de Doutor.

**Botucatu**

**2011**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Departamento de Doenças Tropicais**

**Epidemiologia molecular e fatores de risco para aquisição de clones endêmicos de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) em um hospital de ensino.**

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

**Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de Doutor.

**Botucatu**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP  
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Rodrigues, Marcus Vinicius Pimenta.

Epidemiologia molecular e fatores de risco para aquisição de clones endêmicos de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) em um hospital de ensino / Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Capes: 40101096

1. Estafilococos aureos. 2. Drogas - Resistência a microorganismos.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; MRSA; Resistência; Virulência

Trabalho realizado Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – IBB – UNESP e no Hospital Estadual Bauru – HEB, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processos 2007/05394-6 e 2007/05431-9).

---



*Epígrafe*

“Não me envergonho de mudar de  
idéia, porque não me envergonho de  
pensar”

Mario Quintana

---



*Dedicatória*

À meus avós  
Bolivar e Edite, meu porto seguro...

---

À minha mãe  
Lena, amor incondicional...

---

A o meu companheiro  
Danilo, de sempre para sempre...

---



## *Agradecimientos*

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha por ter aceitado me orientar durante esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza pela idéia inicial do projeto associando os dados laboratoriais aos dados clínicos, e pelas indicações e auxílios em momentos cruciais e fundamentais para a viabilização e finalização desse trabalho.

Aos médicos, enfermeiros e residentes que auxiliaram em diversos momentos no levantamento dos prontuários.

Às biomédicas Natália Bibiana Teixeira e Camila Sena Martins Souza carinho e auxílio fundamental com os procedimentos microbiológicos e por terem deixado de ser alunas e passaram a ser minhas amigas.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que passaram pelo laboratório enquanto estive lá, em especial a Mestranda Valeria Catanelli Pereira pelo companheirismo, amizade e paciência sempre, ao Doutorando André Martins companheiro de noites, madrugadas e finais de semana realizando experimentos e ao eterno doutorando Jackson Eliezer Neves Batalha pelo jeito simples e carismático que conquista a todos por onde passa.

À biomédica mestre Leticia Teixeira Pazzini companheira de viagens e para compartilhar frustrações e muitas alegrias, amiga e sempre e para sempre.

---

Aos amigos conquistados durante os anos que estive no programa em especial: Daniela, Eliana, Larissa, Talísia e Thales.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais pelo aprendizado e pela honra de aprender sobre a gestão do programa durante os três anos de representação discente no Conselho do Programa.

Aos docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo carinho, pela força e pelo excelente convívio durante minha estadia nesse departamento.

Às secretárias Leonice Aparecida Garcia e Sônia Maria Faraldo pela torcida e carinho sempre.

À secretária Solange Sako Cagliari pela forma prestativa com que sempre me recebeu.

À Fundação de Amparo a Pesquisa – FAPESP pelo auxílio financeiro ( processos 2007/05394-6 e 2007/05431-9) para o desenvolvimento deste trabalho.

---



## *Sumário*

Resumo

Abstract

Introdução..... 22

Objetivos..... 29

Materiais e Métodos..... 31

Resultados..... 41

Discussão..... 74

Considerações Finais..... 87

Referências..... 90

Anexo..... 108

---



*Resumo*

---

Os *Staphylococcus aureus* são os principais microrganismos causadores de infecções nosocomiais, com uma grande variedade de manifestações clínicas, a variação deste espectro de manifestações geralmente depende dos numerosos fatores de virulência que cada cepa produz, entretanto, a importância desses patógenos está inserida na combinação da virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência a antibióticos. O presente estudo teve por objetivos documentar a disseminação de clones endêmicos e identificar os fatores individuais relacionados à sua aquisição, e relacioná-los a prevalência de fatores de resistência e virulência em cepas de MRSA isoladas de culturas clínicas e/ou de vigilância de pacientes de um hospital de ensino. No presente trabalho 1078 amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes internados no Hospital Estadual Bauru foram identificadas e testadas fenotipicamente frente a oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg) e gentamicina (10 µg) sendo que dessas, 810 (75.1%) apresentaram perfil fenotípico para *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina – MRSA. A avaliação genotípica do perfil de resistência foi realizada através da amplificação do gene *mecA* pela técnica de PCR onde foi observado que das 443 amostras testadas foi detectado o gene *mecA* em 336 amostras (75.8%), e que dessas, 305 amostras (90.8%) apresentaram perfil SCC*mec* Tipo III ou Tipo IIIA, 6 amostras (1.8%) Tipo II e 25 amostras (7.4%) Tipo IV. A avaliação do perfil genotípico de virulência mostrou a seguinte distribuição, 15.6% (n=69) genes da Leucocidina de Pantone Valentine (*lukPV*), 14% (n=62) gene da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*), 31.8% (n=141) gene da Enterotoxina A (*sea*), 19.8% (n=88) gene da Enterotoxina B (*seb*), 38.1% (n=169) gene da Enterotoxina C (*sec-1*), 100% (n=443) gene da Hemolisina Delta (*hld*), 99.5% (n=441) Hemolisina Alfa (*hla*), 0.9% (n=4) Toxina Esfoliativa A (*eta*), 3.6% (n=16) Toxina Esfoliativa B (*etb*) e 0.4% (n=2) Toxina Esfoliativa D (*etd*). Em relação à produção de biofilme 97.5% (n=432) foram positivas para o gene *icaA* e 97% (n=430) para o gene *icaD*. A análise multivariada dos fatores de virulência relacionados com a capacidade de invasão das amostras de *S. aureus* através da comparação dos fatores de virulência das amostras isoladas de culturas clínicas (n=84) e de vigilância (n=225) mostrou que amostras MRSA com SCC*mec* Tipo III podem ser 2.19 vezes mais invasivas que as demais amostras de *S. aureus* e que amostras com SCC*mec* Tipo IV podem ser 5.28 vezes mais invasivas que as demais amostras. Também foi possível

---

observar entre os fatores de virulência estudados que os genes que codificam a Leucocidina de Pantón Valentine (*pvl*) ou esfoliatina B (*etb*) foram fatores independentemente associados a invasão (*odds ratio* - OR de 2.38 e 6.38, respectivamente). Na análise do perfil clonal por Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE das amostras MRSA invasivas foi possível observar a presença de 4 grupos clonais majoritários enquanto que a análise do perfil clonal das amostras colonizantes demonstrou a presença de 7 clones majoritários. O perfil clonal dos MRSA isolados de pacientes queimados demonstrou 2 grupos majoritários: Grupo A (S<sub>ab</sub> 82.3) e Grupo B (S<sub>ab</sub> 83.3). A análise multivariada para avaliação de fatores de risco para aquisição de MRSA em pacientes não queimados demonstrou como fatores de risco a cirurgia (OR= 3.01) e úlcera de pressão (OR= 11.4). Em pacientes queimados a análise multivariada revelou como fatores de risco significativos o histórico de internação maior que 24h em outro serviço (OR= 7.8), número de debridamentos (OR=6.8) e internação prévia ou atual em UTI (OR=3.6). O conhecimento da epidemiologia e dos fatores de risco para aquisição de MRSA colonizantes ou invasivos no hospital estudado são dados importantes que podem auxiliar na prevenção e controle desses microrganismos.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; MRSA; Resistência; Virulência

---



*Abstract*

*Staphylococcus aureus* are the most common microorganisms causing nosocomial infections, with a wide variety of clinical manifestations, the variation of the spectrum of manifestations generally depends upon the numerous virulence factors that each strain produces, however, the importance of these pathogens is included in the combination of virulence mediated by their toxins, its invasive nature and profile of antibiotic resistance. This study aimed to document the spread of endemic clones and identify the individual factors related to its acquisition, and relate them to the prevalence of resistance and virulence factors in strains of MRSA isolated from clinical cultures and / or surveillance patients a teaching hospital. In this study 1078 samples of *Staphylococcus aureus* from hospitalized patients in Bauru State Hospital were identified phenotypically and tested against oxacillin (1  $\mu$  g), cefoxitin (30  $\mu$  g), vancomycin (30  $\mu$  g), erythromycin (15  $\mu$  g) and gentamicin (10  $\mu$  g) and that these, 810 (75.8%) showed phenotypic profile for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA. The evaluation of genotypic resistance profiles was performed by amplification of the *mecA* gene by PCR where it was observed that of 443 samples tested was detected *mecA* gene in 336 samples (75.8%), and that these, 305 samples (90.8%) profile were SCC*mec* type III or type IIIA, six samples (1.8%) type II and 25 samples (7.4%) type IV. The evaluation of virulence genotype was distributed as follows, 15.6% (n = 69) genes of Pantone Valentine Leukocidin (*lukPV*), 14% (n = 62) gene for toxic shock syndrome (*tst*), 31.8% (n = 141) gene of enterotoxin A (*sea*), 19.8% (n = 88) gene of enterotoxin B (*seb*), 38.1% (n = 169) gene of enterotoxin C (*sec-I*), 100% (n = 443) Delta Hemolysin gene (*hld*), 99.5% (n = 441) Alpha Hemolysin gene (*hla*), 0.9% (n = 4) Exfoliative toxin A (*eta*), 3.6% (n = 16) Exfoliative toxin B (*etb*) and 0.4 % (n = 2) Exfoliative toxin D (*etd*). In relation to biofilm production 97.5% (n = 432) were positive for the gene *icaA* and 97% (n = 430) for the gene *icaD*. Multivariate analysis of virulence factors related to the invasiveness of strains of *S. aureus* by comparing the virulence factors of strains isolated from clinical cultures (n = 84) and surveillance (n = 225) showed that samples MRSA with SCC*mec* type III may be 2.19 times more invasive than other strains of *S. aureus* and that samples with SCC*mec* type IV may be 5.28 times more invasive than the other samples. Was also observed among the virulence factors the genes encoding the Pantone Valentine Leukocidin (*pvl*) or Exfoliative toxin B (*etb*) were factors independently associated with invasion (*odds*

---

*ratio* - OR of 2.38 and 6.38, respectively). In profile analysis of clonal by pulsed-field gel electrophoresis - PFGE of invasive MRSA samples could observe the presence of four major clonal groups while the analysis of clonal profile of the samples showed the presence of colonizing clones 7 majority. The clonal profile of MRSA isolated from burn patients showed two major groups: Group A (Sab 82.3) and Group B (Sab 83.3). The multivariate analysis for risk factors for MRSA acquisition in patients unburnt demonstrated as risk factors for surgery (OR = 3.01) and pressure ulcers (OR = 11.4). Burned patients multivariate analysis showed as risk factors signifiers history of hospitalization than 24 hours in another hospital (OR = 7.8), number of debridements (OR = 6.8) and current or previous hospitalization in the ICU (OR = 3.6). Knowledge of the epidemiology and risk factors for acquisition of MRSA colonizing or invasive in the hospital are important data that can help prevent and control these microorganisms.

Key-words: molecular epidemiology; MRSA; Resistance; Virulence

---



## *Introdução*

*Staphylococcus aureus* pode causar uma grande variedade de infecções, muitas delas adquiridas no ambiente hospitalar. A grande transmissibilidade, o seu elevado potencial patogênico e a possibilidade de resistência a múltiplos antimicrobianos, são itens relevantes que contribuem para a relevância das infecções estafilocócicas em hospitais e outros serviços de saúde. Boa parte da população humana é portadora desta bactéria sendo que a maioria não apresenta quaisquer sintomas de infecção, nesses os principais nichos são a mucosa nasal e o períneo. A esse padrão de carreamento, no qual se observa reprodução bacteriana sem interação imunológica ou doença clínica, dá-se o nome de “colonização”. Tanto o indivíduo colonizado quanto aqueles que apresentam infecção podem transmitir eficazmente o *S. aureus* através de contato direto ou indireto. Esse fenômeno, denominado “transmissão cruzada”, apresenta dinâmica aumentada no ambiente hospitalar e esse fato tem como significativa contribuição a gravidade inerente dos indivíduos internados, os procedimentos invasivos realizados no hospital, o uso de antimicrobianos e a ocorrência denominada “understaffing” (ou seja, um baixo número de profissionais prestando assistência a uma grande quantidade de pacientes)<sup>(1)</sup>.

Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções causadas por *S. aureus*. As células de *S. aureus* apresentam alguns componentes de superfícies, incluindo moléculas de adesão, peptidoglicano e proteína A que conferem a esses microrganismos a capacidade de evadir-se do sistema imune do hospedeiro<sup>(2,3,4)</sup>, assim como produzem várias enzimas extracelulares, tais como a catalase, nucleases, hialuronidases, lipase, fibrinolisinases que hidrolisam diferentes proteínas e outras moléculas, gerando nutrientes utilizáveis pelo *S. aureus* e ao mesmo tempo facilitando a sua disseminação pelos tecidos<sup>(5)</sup>. Algumas cepas ainda são capazes de produzir uma ou mais toxinas que podem ser enquadradas, de forma geral, em dois grupos, os agentes ativos em membranas, que compreendem as toxinas alfa, beta, delta e gama, como também a leucocidina de Pantón-Valentine (genes *pvl*, *LukE-lukD*), designada como PVL, e as toxinas com atividades de superantígenos (SAGs), que incluem a família das toxinas pirogênicas (PTs) que são as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e a família das toxinas esfoliativas (ETs)<sup>(6)</sup>. Alguns dos genes dessas toxinas podem ser freqüentemente transportados por elementos genéticos móveis, tais como fagos e ilhas de patogenicidade (SaPIs), as quais são segmentos de DNA de variados tamanhos,

---

potencialmente móveis, codificadores de genes associados à virulência, sendo transferidos horizontalmente entre as cepas, como exemplo, pode-se citar genes que codificam enterotoxina B e C, e a toxina da síndrome do choque tóxico<sup>(7)</sup>. A importância dos *S. aureus* como patógenos reside na combinação da virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antibióticos<sup>(8)</sup>.

A disseminação de isolados resistentes aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica é um fator limitante para o tratamento das infecções estafilocócicas<sup>(9)</sup>. Um marco importante na terapia estafilocócica foi o surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (*Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), tendo emergido nas últimas décadas, como o patógeno Gram-positivo predominante em infecções hospitalares. Estima-se que ele esteja envolvido em mais de 50% das infecções estafilocócicas adquiridas em serviços de saúde<sup>(10,11,12)</sup>. Os MRSA são resistentes a todos os betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), pois expressam um receptor de baixa afinidade para esses antibióticos. Esses antibióticos se ligam a enzimas bacterianas constitutivas que participam da síntese da parede celular, as proteínas ligadoras de Penicilina (*Penicillin-Binding Protein*, PBP), impedindo seu funcionamento correto. O MRSA tem a capacidade de sintetizar uma variante da PBP2, a PBP2a, mantendo a sua função fisiológica porém, com baixa afinidade pelos betalactâmicos<sup>(13,14)</sup>. O gene que codifica a proteína PBP2a, o gene *mecA*, juntamente com seus genes reguladores, encontra-se em um elemento genético móvel, o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*)<sup>(15)</sup>. Já foram descritos pelo menos 5 tipos de *SCCmec*, que diferem entre si em relação ao número de genes que carregam e em sua arquitetura gênica<sup>(13,16)</sup>. Alguns destes tipos são carreadores de genes determinantes para múltiplos antibacterianos, além dos betalactâmicos, os macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas, aminoglicosídeos e tetraciclina, desta forma, quando uma célula bacteriana adquire estes *SCCmec* de uma única vez adquire um fenótipo de múltipla-resistência<sup>(13,14)</sup>.

Oito tipos de *SCCmec* já foram definidos através da 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 cinco classes do complexo gene *mec* (classe A, B, C1, C2 e classe D)<sup>(17,18)</sup>. Os diferentes tipos de *SCCmec* são classificados como: *SCCmec* tipo I (complexo gene *mec* classe B e *ccrA1B1*), *SCCmec*

---

tipo II (complexo gene *mec* classe *A* e *ccrA2B2*), *SCCmec* tipo III (complexo gene *mec* classe *A* e *ccrA3B3*), *SCCmec* tipo IV (complexo gene *mec* classe *B* e *ccrA2B2*), e *SCCmec* tipo V (complexo gene *mec* classe *C2* e *ccrC*), *SCCmec* tipo VI (complexo gene *mec* classe *B* e *ccrA4B4*), *SCCmec* tipo VII (complexo gene *mec* classe *C1* e *ccrC*) e *SCCmec* tipo VIII (complexo gene *mec* classe *A* e *ccrA4B4*). A região restante do *SCCmec* é chamada de região J (Joining region), que constitui componentes não essenciais do cassete que podem carrear determinantes de resistência antimicrobiana adicionais<sup>(7, 18)</sup>.

O tratamento de infecções por MRSA torna-se complicado devido ao número limitado de opções terapêuticas seguras. A opção terapêutica de escolha deve considerar o perfil de sensibilidade a antibióticos de cada isolado, sendo que de forma geral, um glicopeptídeo é uma boa opção especialmente contra isolados que carregam o *SCCmec* tipo III, sendo este o tipo que confere um fenótipo mais multiresistente<sup>(7,19)</sup>. As cepas com *SCCmec* tipo I, IV e V são geralmente mais sensíveis aos antibióticos em relação aos outros tipos de *SCCmec*, pois esse tipos não contem genes de resistência, com exceção do *mecA*, entretanto o *SCCmec* subtipo IVc apresenta genes que conferem resistência a aminoglicosídeos<sup>(7)</sup>. O *SCCmec* tipo II apresenta genes que codificam resistência a eritromicina, spectinomicina, kanamicina, bleomicina e tobramicina<sup>(20)</sup>. Todavia, no Brasil a prevalência no isolamento de cepas MRSA varia de 40% a 80%, sendo que nesses isolados o tipo III é o mais prevalente em infecções nosocomiais, apresentando geralmente resistência a aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamidas, macrolídeos, quinolonas, sulfametoxazol-trimetropim e tetraciclina, com grande susceptibilidade apenas à rifampicina e aos glicopeptídeos, portanto, a demanda por um glicopeptídeo nos casos destas infecções é alta<sup>(21-24)</sup>.

Observações feitas por Darwin a respeito da seleção natural de cepas e espécies ajudam a compreender a disseminação da resistência aos antibióticos em ambientes hospitalares, onde a pressão representada pela antibioticoterapia é maior, o que determina vantagens seletivas para a proliferação de cepas resistentes<sup>(1,25)</sup>. O papel dos antimicrobianos como facilitadores da disseminação de fenótipos de resistência está bem estabelecida, embora aspectos de sua influência permaneçam sob debate. A disseminação de cepas resistentes (“transmissão cruzada”) de paciente a paciente através de profissionais da saúde, dispositivos e equipamentos também tem papel

---

definido na disseminação de resistência<sup>(26)</sup>. Recentes avanços científicos considerando a origem genética da resistência a meticilina em *S. aureus* têm alavancado um maior entendimento da epidemiologia do MRSA, análises genéticas detalhadas de cepas de MRSA de diversas partes do mundo revelaram que a transferência do SCC<sub>mec</sub> do MRSA para o *S. aureus* susceptível a meticilina (MSSA) ocorreu poucas vezes, assim sendo, a crescente incidência do MRSA resulta da disseminação mundial de apenas alguns clones, e não da emergência de novos clones de MRSA a partir de cepas sensíveis<sup>(27,28)</sup>. Esses resultados sugerem virtualmente, que todos os pacientes que apresentam infecções ou colonização por MRSA adquiriram suas cepas de uma fonte externa. A transmissão de clones de uma cidade a outra, de um país ao outro e até mesmo de um continente a outro foi determinada pela transferência de pacientes infectados ou colonizados com MRSA<sup>(29)</sup>. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que as medidas de controle sejam direcionadas à interrupção da transmissão, sendo que a restrição do uso de antibióticos pode trazer benefício adicional, mas este tem sido questionado por alguns autores<sup>(1)</sup>.

Estudos da disseminação geográfica de clones epidêmicos multirresistente de *S. aureus* no Brasil demonstraram que isolados testados apresentaram um mesmo fenótipo de resistência a meticilina, e a maior parte desses isolados (>70%) era multirresistente a pelo menos 9 antibióticos, além disso, os clones estavam amplamente disseminados em diversas regiões do Brasil. A disseminação de um clone brasileiro endêmico de MRSA (BEC) em muitos hospitais do Brasil, América do Sul e Europa também tem sido descrita<sup>(30-33)</sup>.

As infecções por MRSA são associadas com considerável morbidade e mortalidade, sendo também mais caras de se manejar comparadas a outras infecções. Esse aumento considerável nos gastos relativos a manejo dessas infecções é devido à hospitalização prolongada, ao aumento dos cuidados em isolamento, além de cuidados médicos adicionais e da sobrecarga financeira em terapia secundária. O grande impacto do MRSA sobre morbidade, mortalidade e custos, sem sido amplamente documentado nos Estados Unidos e em países da Europa<sup>(10,11)</sup>.

O sucesso no controle de MRSA tem sido grande em países que aderiram a rigorosas políticas de controle de infecção hospitalar baseadas na transmissão e na restrição do uso de antibióticos. Essas medidas incluem culturas ativas de vigilância

---

para identificação de pacientes colonizados ou infectados com MRSA, também aplicam rígidas medidas de precaução e isolamento, além disso, adotam a quarentena para pacientes recém admitidos no serviço hospitalar até que se afaste a possibilidade de colonização por MRSA<sup>(34)</sup>.

Até a década de 1990, o MRSA foi isolado apenas em ambientes hospitalares. No entanto, a transmissão de MRSA fora do hospital tem sido reportada nos últimos anos. Nesse contexto, identificaram-se isolados com características genéticas específicas, denominados CA-MRSA (*Community-acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). Teme-se uma ampla disseminação do CA-MRSA na comunidade, o que tornaria inócua qualquer medida de controle do MRSA nos hospitais<sup>(35)</sup>.

A proporção de pacientes colonizados por MRSA em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é o maior fator de risco para a aquisição de MRSA em novos pacientes ali internados<sup>(36)</sup>. Taxas de colonização ou infecção com MRSA podem variar de acordo com a localização geográfica, tipo de serviço hospitalar e população específica.

Estudos demonstram que a localização do paciente no interior da UTI pode ser um fator de risco para aquisição de MRSA<sup>(37)</sup>. Pacientes colonizados contaminam o ambiente com suas cepas facilitando a transmissão cruzada. Esse fato ressalta a importância de medidas de precaução e isolamento de pacientes colonizados ou infectados por MRSA, complementadas por protocolos eficazes de higiene, limpeza e manutenção dos ambientes hospitalares<sup>(38)</sup>.

Em geral, as ocorrências epidêmicas de MRSA recebem maior atenção. Esse fato é explicado pelo súbito aumento de morbidade e mortalidade por infecções hospitalares na vigência de surtos. Surtos e epidemias podem ter conseqüências devastadoras, no entanto, são de mais fácil controle, uma vez que se identifiquem os fatores que colaboraram para sua ocorrência, por outro lado, perfis endêmicos são de difícil manejo. Intervenções eficazes para reduzir taxas endêmicas de MRSA exigem ampla revisão de processos de trabalho e normatização dos procedimentos para identificação e isolamento de carreadores<sup>(1)</sup>. Deve-se enfatizar que a colonização por MRSA é de difícil erradicação. Além disso, estudos apontam que indivíduos previamente colonizados são mais suscetíveis à colonização subsequente ao longo da internação e mesmo após a alta hospitalar<sup>(37,39)</sup>.

---

Discute-se a necessidade de atenção para a disseminação de cepas suscetíveis (MSSA) nos hospitais. Dois itens são levantados: a possibilidade (ainda que infreqüente) de emergência de MRSA a partir de MSSA<sup>(40, 41)</sup> e a observação de que MSSA e MRSA geralmente não diferem em termos de virulência, de fato, os estudos têm demonstrado que a maior mortalidade por MRSA deve-se provavelmente a antibioticoterapia inadequada ou à doença de base do hospedeiro, e não à virulência aumentada desse fenótipo. Esse assunto é ainda controverso e representa um campo aberto para investigação.

É possível que alguns clones de MRSA sejam mais propensos que outros a determinar doença invasiva, isto pode dever-se à presença de fatores de virulência, que aumentam suas chances de alcançar sítios normalmente estéreis e sobreviver, proliferar e disseminar no hospedeiro. Esses fatores podem relacionar-se a secreção de exotoxinas, hemolisinas, leucocidinas, etc. e também a produção de biofilme<sup>(42)</sup>. Embora muitos fatores de virulência do *S. aureus* tenham sido identificados em seu genoma, as diferenças de potencial patogênico e invasivo entre as cepas disseminadas no ambiente ainda é desconhecida<sup>(43,44)</sup>.

A compreensão da epidemiologia das infecções por MRSA tem implicações importantes para as medidas de controle. Para isso, torna-se necessário documentar a disseminação de clones e identificar os fatores individuais relacionados a sua aquisição. Estes são os objetivos centrais deste projeto. Além disso, identificamos a prevalência de fatores de virulência em cepas de MRSA isoladas de culturas clínicas e/ou de vigilância de pacientes de um hospital de ensino.

---



*Objetivos*

## OBJETIVOS GERAIS

Estudar a distribuição de clones endêmicos do MRSA nas diversas enfermarias de um hospital de ensino, identificando os fatores de risco associados a sua aquisição e a prevalência de fatores de resistência e virulência em isolados de MRSA hospitalares obtidos a partir de culturas clínicas e/ou de vigilância.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil clonal de cepas de MRSA isoladas de culturas de vigilância e de amostras clínicas hospitalares pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) com utilização de enzimas de restrição agrupados através de coeficientes de similaridade *Sab*.
  - Determinar o tipo de *SCCmec* das cepas isoladas.
  - Determinar genotipicamente os fatores de virulência para produção de leucocidina de Panton Valentine, hemolisinas alfa e delta, toxina da síndrome do choque tóxico, produção de biofilme, toxinas esfoliativas e enterotoxinas.
  - Comparar os perfis clonais das cepas endêmicas invasivas e colonizantes de MRSA e MSSA isoladas e identificar fatores de virulência associados à invasividade.
  - Identificar fatores de risco para colonização/infecção por MSSA e MRSA em pacientes do Hospital Estadual Bauru.
  - Identificar fatores de risco específicos para colonização/infecção por isolados de MRSA portadores do gene da Leucocidina de Panton Valentine (*pvl*).
-



## *Materiais e Métodos*

## LOCAL DE ESTUDO

O Hospital Estadual Bauru (HEB) é um hospital de ensino administrado pela Faculdade de Medicina de Botucatu / Universidade Estadual Paulista (FMB UNESP). O HEB tem 285 leitos distribuídos em serviços clínicos, cirúrgicos e pediátricos. Possui quatro UTIs: de adultos; pediátrica; coronariana e de queimados. Além disso, há uma unidade semi-intensiva para atenção a pacientes queimados. A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HEB realiza vigilância ativa das infecções hospitalares em todas as unidades do hospital. Ela também monitora as taxas de incidência de microrganismos multirresistentes. Essa atividade se dá de duas formas: pela avaliação sistemática dos resultados de culturas clínicas das enfermarias e UTIs e pela coleta semanal de culturas de vigilância em UTIs e na unidade de queimados. As culturas de vigilância para identificação de MRSA são obtidas por *swabs* de nasofaringe e/ou de área queimada nos pacientes internados há mais de 48 horas e/ou transferidos de outros hospitais. As culturas de vigilância para identificação de MRSA foram obtidas por *swabs* de nasofaringe e/ou de área queimada são obtidas à admissão e depois semanalmente nas UTIs e no setor de atendimento de queimados.

## AMOSTRAS

Foram isoladas e identificadas como *Staphylococcus aureus* 1078 amostras coletadas de 363 pacientes internados no Hospital Estadual Bauru (HEB) no período de Outubro de 2006 a Março de 2009, isoladas de culturas de vigilância, swabs de queimaduras, secreções, hemoculturas e outros materiais clínicos (ponta de cateter, fragmento de músculo, bolha, etc). Todas as amostras foram identificadas e testadas quanto à sensibilidade a Oxacilina e Cefoxitina, e também testadas quanto a sensibilidade frente a vancomicina, eritromicina e gentamicina. Já a genotipagem foi realizada com 443 amostras segundo os seguintes critérios para seleção: com a 1º amostra de cada paciente e em alguns casos quando houve hemocultura e cultura de vigilância dentro do mesmo período, com amostras de um mesmo paciente coletadas em

---

grande espaço de tempo, com culturas de vigilância e outro material clínico relevante para o mesmo paciente. As amostras isoladas foram categorizadas como cultura de vigilância (swab nasal e axilar), swab de queimadura, secreções (secreção uretral e de incisão cirúrgica), hemoculturas e outros materiais clínicos (ponta de cateter, bolha, fragmento de músculo, pele, cultura de tecido cirúrgico e tecido subcutâneo).

### **AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

### **AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

A determinação fenotípica do perfil de resistência foi realizada para os 1078 isolados obtidos através da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI<sup>(45)</sup>. As drogas utilizadas foram: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg) e gentamicina (10 µg). A interpretação foi realizada segundo as normas estabelecidas pelo CLSI<sup>(45)</sup>.

### **AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

Para a determinação genotípica foi realizada a técnica de PCR para amplificação do gene *mecA*. As amostras positivas para o gene *mecA*, foram subtipadas pela técnica PCR-Multiplex conforme descrito por Oliveira e Lencastre<sup>(46)</sup> para determinação do tipo de Cassete Cromossômico Estafilocócico (SCC*mec*).

Como controle positivo para detecção do gene *mecA* foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e como controle negativo a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como controle para a tipagem do SCC*mec* foram utilizadas as

---

cepas COL para SCCmec tipo I; N315 para SCCmec tipo IA; PER34 para o SCCmec tipo II; AN546 para o SCCmec tipo III; HU25 para o SCCmec tipo IIIA e MW2 para o SCCmec tipo IV.

### **AVALIAÇÃO DO PERFIL DE VIRULÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

A avaliação do perfil de virulência foi realizada apenas genotipicamente pela técnica de PCR, onde as amostras foram avaliadas quanto a presença dos genes das enterotoxinas A, B e C (*sea*, *seb* e *sec-1*), toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina de Pantón Valentine (*LukPV*), hemolisina alfa (*hla*), hemolisina delta (*hld*), toxinas esfoliativas A, B, e D (*eta*, *etb* e *etd*) e biofilme (*icaA* e *icaD*) (Tabela 1).

---

**Tabela 1:** Fatores de virulência estudados.

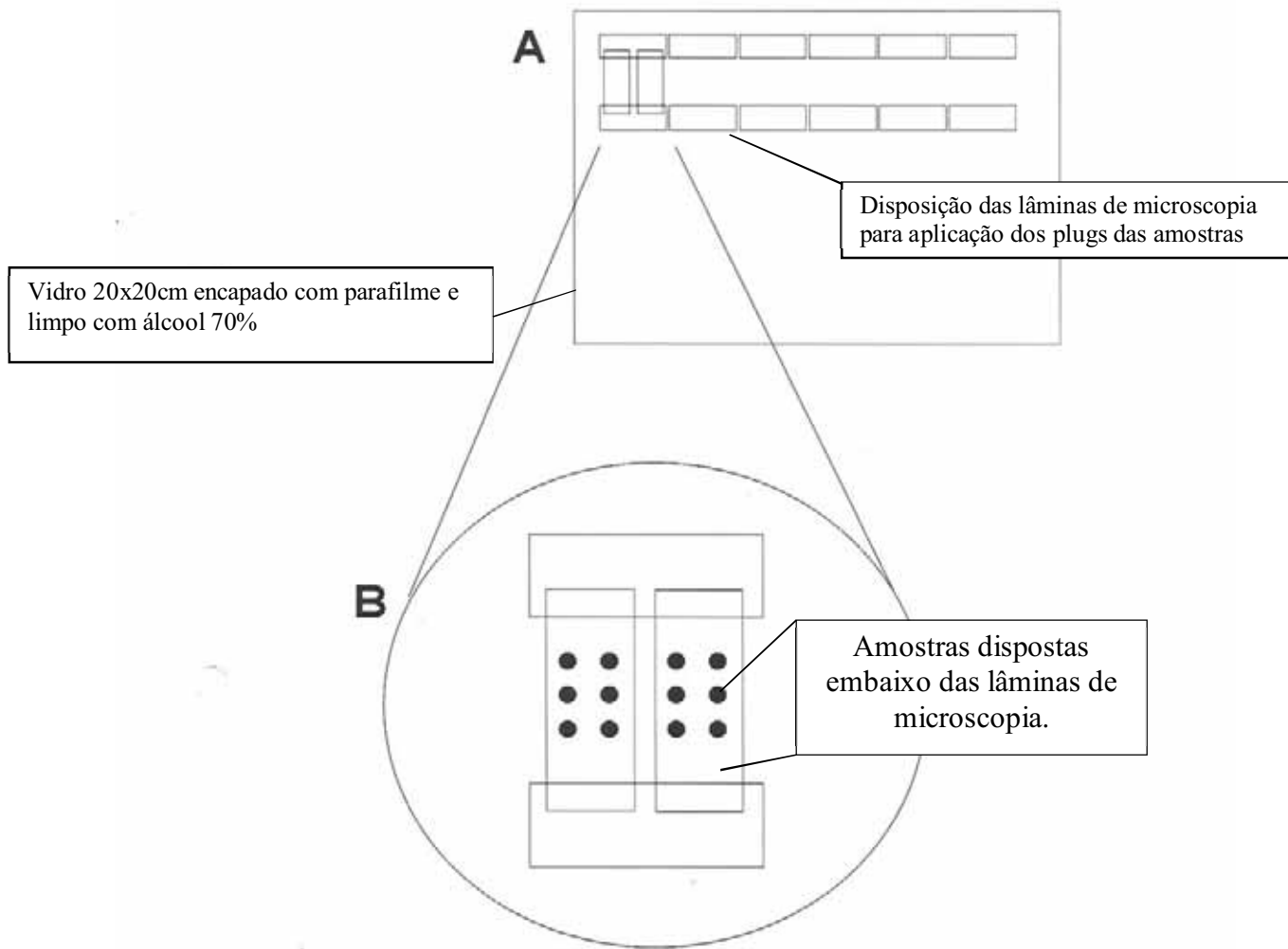
| Fator de virulência                   | Gene         | Primer                          | Tm <sup>1</sup> | Produto <sup>2</sup> | Controle <sup>3</sup>           | Referência                                      |
|---------------------------------------|--------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------------------|---|
| Enterotoxinas                         | <i>sea</i>   | ttggaacgggtaaaacgaa             | 55°C            | 120 pb               | ATCC 13565                      | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
|                                       |              | gaacctcccatcaaaaaca             |                 |                      |                                 |   |
|                                       | <i>seb</i>   | tcgcatcaaaactgacaacg            | 55°C            | 478pb                | ATCC 14458                      | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
| gcaggtactctataagtgcc                  |              |                                 |                 |                      |                                 |   |
| Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico | <i>sec-1</i> | gacataaaagctaggaattt            | 55°C            | 257pb                | ATCC 19095                      | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
|                                       |              | aaatcggattaacattatcc            |                 |                      |                                 |   |
| Leucocidina Panton Valentine          | <i>tst</i>   | atggcagcatcagcttgata            | 55°C            | 350pb                | N315                            | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
|                                       |              | ttccaataaccaccggtt              |                 |                      |                                 |   |
| Biofilme                              | <i>LukPV</i> | atcattaggtaaaatgtctggacatgatcca | 55°C            | 433pb                | USA300**                        | Lina et al. <sup>(48)</sup>                     |
|                                       |              | gcatcaastgtattggatagcaaaagc     |                 |                      |                                 |   |
|                                       | <i>icaA</i>  | tctcttgaggagcaatcaa             | 55,5°C          | 188pb                | 658*                            | Arciola, Baldassari <sup>(49)</sup> & Montanaro |
| tcaggcactaacatccagca                  |              |                                 |                 |                      |                                 |   |
| Toxina Esfoliativa                    | <i>icaD</i>  | atggtcaagccagacagag             | 55,5°C          | 198pb                | 658*                            | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
|                                       |              | cgtgtttcaacatttaatgcaa          |                 |                      |                                 |   |
| Hemolisina                            | <i>eta</i>   | ctagtcattgttattcaa              | 55°C            | 119pb                | N5***                           | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
|                                       |              | tgcattgacaccatagtact            |                 |                      |                                 |   |
|                                       | <i>etb</i>   | acggctatatacatcattcaatt         | 55°C            | 200pb                | ZM***                           | Johnson et al <sup>(47)</sup>                   |
| tccatcgataatatacctaa                  |              |                                 |                 |                      |                                 |   |
| Hemolisina                            | <i>etd</i>   | aactatcatgtatcaagg              | 55°C            | 376pb                | Yamaguchi et al <sup>(50)</sup> |   |
|                                       |              | cagaatttcccactcag               |                 |                      |                                 |   |
|                                       | <i>hla</i>   | ctgattactatccaagaaattcgattg     | 55°C            | 209pb                | N315                            | Jarraud et al <sup>(51)</sup>                   |
| ctttccagcctactttttatcagt              |              |                                 |                 |                      |                                 |   |
| Hemolisina                            | <i>hld</i>   | atggcagcagatatcatttc            | 55°C            | 357pb                | N315                            | Marconi et al <sup>(21)</sup>                   |
|                                       |              | cgtgagctgggagagac               |                 |                      |                                 |   |

<sup>1</sup> Tm: Temperatura de anelamento; <sup>2</sup> Tamanho: tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb); <sup>3</sup> Controle: cepas utilizadas como controle positivo. \* Cepas utilizadas como padrão foram previamente definidas em termos de suas características de virulência. \*\* Clone USA300 gentilmente cedido pela Profa Dra Agnes de Sá Figueiredo da UFRJ. \*\*\* Gentilmente cedido pela Profa Dra Agnes Elza Mamizuka da USP.

## DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLONAL DAS AMOSTRAS MRSA

O protocolo “*in house*” padronizado para o presente projeto foi adaptado dos protocolos de Chung et al<sup>(53)</sup> e Pfaller<sup>(54)</sup>. As culturas puras de MRSA foram crescidas em caldo BHI overnight a 37°C. Após esse período 1mL da cultura crescida foi transferida para microtubo de 1,5mL previamente pesado e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em vortex com 1 mL de solução PIV e centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos. O pellet foi então pesado e ressuspensionado em EDTA 50mM pH 8,0 para uma concentração final de 100µg de massa bacteriana por µL. Foi pesado 0,3g de agarose low melting em 20mL de solução PIV em garrafa de boca larga, diluído em microondas e depois mantido a 42°C por pelo menos 10 minutos antes do uso. Um vidro de 20cm por 20cm foi encapado com parafilme e em seguida limpo com álcool 70%. Lâminas de microscopia também previamente limpas com álcool 70% foram distribuídas conforme indicado na Figura 1A. Pipetou-se 100µL da suspensão 100µg/µL em outro microtubo de 1,5mL, incubou-se a 42°C por 10 minutos, posteriormente adicionou-se 100µL da agarose low melting previamente diluída, onde agitou-se levemente com a própria micropipeta. Com micropipeta depositou-se 20µL da suspensão bacteriana acrescida de agarose no vidro conforme indicado na Figura 1B de modo que uma lâmina de microscopia cobrisse cada jogo de plugs de agarose de cada amostra estudada (Fig. 1B). Essas lâminas cobrindo as amostras deprimiram o lado convexo das gotas de agarose deixando-as na forma de um disco para facilitar a inserção dessas amostras no gel. Posteriormente o vidro foi colocado em freezer (-20°C) por no máximo 5 minutos e a temperatura ambiente por 10 minutos, e em seguida retiraram-se cuidadosamente as lâminas superiores.

---



**Figura 1:** Esquema da aplicação de amostras nos plugs de agarose no protocolo de PFGE

Os discos foram transferidos para uma placa de 24 poços, sendo 1 poço para cada jogo de plugs de agarose de cada amostra de *S. aureus* incluída no presente estudo. Adicionou-se solução de lise EC, observando se os discos estavam todos submersos e incubou-se a 37°C/24h. Retirou-se o tampão de lise EC e adicionou-se 1 mL de solução ESP com Proteinase K e incubou-se 56°C overnight. Os discos foram lavados com 1mL de TE por 4 vezes por 30 minutos em agitação a temperatura ambiente. Os discos que não foram utilizados imediatamente foram estocados a 4°C em TE. Para restrição enzimática foi utilizada enzima de restrição FastDigest® SmaI (CCC↓GGG) (Fermentas Life Sciences, CA). Um disco de cada amostra testada foi transferido para microplaca

de 24 poços e lavado 4 vezes com 1mL de solução tampão DNS por 1h a temperatura ambiente. Após as lavagens o tampão DNS foi retirado e adicionado 100µL de solução Tampão FastDigest® IX 1x concentrado e 1µL da enzima FastDigest® SmaI e incubou-se 6 minutos a 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose para PFGE (AMRESCO, USA) em TBE 0,5X a 14°C com pulso inicial de 5 segundos e final de 40 segundos com 20h de corrida em ângulo de 120° e voltagem de 6V/cm. Após corrida o gel foi corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x em DMSO (Biotium Inc., CA). O gel de agarose a ser corado foi depositado em uma cuba de polipropileno e adicionou-se uma solução com 15µL de GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x em 45mL de água e 5mL de NaCl 1M, esse gel foi incubado sob agitação leve por 1 hora protegido da luz e fotografado sob transluminação ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular o Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs, Inc., USA) com extensão das bandas de 48,5Kb até 1,0Mb.

## **ESTUDO DOS DETERMINANTES MOLECULARES DE VIRULÊNCIA**

Partiu-se do princípio de que culturas de vigilância identificam colonização, enquanto as culturas clínicas apontam para doença. Realizou-se estudo comparativo da presença de fatores de virulência e da presença de SCC*mec* entre isolados obtidos de culturas de vigilância e de culturas clínicas.

Para pacientes com isolamento de *S. aureus* em múltiplas culturas de vigilância, somente a primeira delas (em ordem cronológica) foi selecionada para esta análise. O mesmo princípio foi aplicado para as culturas clínicas. A análise univariada foi realizada pelos testes do Chi-quadrado ou Exato de Fisher, quando recomendado. Para análise multivariada, todas as variáveis foram simultaneamente introduzidas em modelo único de regressão logística, considerando-se limite final de significância de 0,05. Todas as análises foram realizadas em *software* SPSS versão 15.0 (© SPSS, inc).

---

## ESTUDOS DE CASO-CONTROLE

### *Fatores de Risco para MRSA e MSSA*

Fatores de risco individuais para aquisição de MRSA e MSSA foram abordados através de estudos “caso-controle”. Em todos eles, os “casos” foram selecionados entre os pacientes com culturas positivas para MRSA ou MSSA. Os controles foram selecionados da mesma base populacional, com o critério de ausência de culturas positivas para *S. aureus*. Para realização dos estudos “caso-controle”, seguimos as diretrizes metodológicas propostas por Harris et al<sup>(55)</sup>. Essas diretrizes incluem: seleção de controles da mesma população de onde surgiram os casos; ajuste para gravidade de base dos pacientes; ajuste para “tempo sob risco” (ou seja, o tempo em que os indivíduos permanecem sob risco de aquisição do microrganismo).

Dados foram coletados em revisão de prontuário e consulta. Foram registrados dados demográficos (idade e sexo), presença de co-morbidades, uso de dispositivos, realização de procedimentos e administração de antimicrobianos. Investigações das relações entre a gravidade dos pacientes e a aquisição dos isolados resistentes e a influência do tempo de exposição ao ambiente hospitalar sobre a aquisição de isolados de MRSA empregando a variável “tempo sob risco” foram realizadas segundo recomendações da literatura<sup>(55,56)</sup>. O ajuste para gravidade/co-morbidades foi realizado utilizando-se a pontuação proposta por Charlson et al<sup>(57)</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico e clínico, duas populações bastante diversas de pacientes foram caracterizadas: os queimados e os demais. Por essa razão, e para que pudéssemos abordar fatores de risco específicos, as análises dessas duas populações foram conduzidas em separado.

### **Fatores de Risco para MRSA portadores do SCCmec IV e/ou dos genes codificadores da Leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*).**

Esta etapa da análise visava responder à pergunta: “que fatores clínicos predizem, entre os portadores de MRSA, a presença de cepas com SCCmecIV ou genes codificadores da *pvl*?”. Por essa razão, distribuimos casos e controles de forma diferente da análise anterior.

---

Neste caso, a “população geral” foi definida como o total de pacientes com culturas positivas para MRSA (fossem eles queimados ou não). Casos foram definidos como aqueles de quem foram isoladas amostras SCCmecIV (no primeiro estudo) ou genes codificadores da PVL (segundo estudo). Os demais procedimentos metodológicos (definições, fontes e coletas de dados) foram os mesmos descritos na seção anterior.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ESTUDOS DE FATORES DE RISCO**

Para a coleta e análise dos dados foram utilizados os softwares EPI-INFO for windows, versão 3.2 (© Centers for Disease Control and Prevention, USA) e SPSS versão 15.0 (© SPSS, inc.). Para comparação entre as variáveis categóricas foram realizados testes não-paramétricos para proporção: Chi-quadrado e Teste Exato de Fischer (quando recomendável). Variáveis contínuas foram comparadas através do Teste T de Student e do teste U de Mann-Whitney. Nisso consistiu a análise univariada. Em etapa seguinte (análise multivariada), as variáveis foram incluídas em modelos de regressão logística, segundo processo de seleção por avanços (*stepwise forward*). Foi utilizado parâmetro de significância de 0,05 para inclusão e remoção de variáveis nos modelos. O mesmo parâmetro foi aplicado para definição final de significância.

---



*Resultados*

## AMOSTRAS

Foram estudadas 1078 amostras positivas para *S. aureus* isoladas de culturas de vigilância, swabs de queimaduras, secreções, hemoculturas e outros materiais clínicos (ponta de cateter, fragmento de músculo, bolha, etc) de 363 pacientes internados no Hospital Estadual Bauru (HEB) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Tabela 2). O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por KONEMAN et al<sup>(58)</sup>.

**Tabela 2:** Características das amostras de *Staphylococcus aureus* estudadas no presente relatório

| Material                  | Análise fenotípica |            |            |           |             | Análise genotípica |
|---------------------------|--------------------|------------|------------|-----------|-------------|--------------------|
|                           | 2006               | 2007       | 2008       | 2009      | Total       | Total              |
| Hemocultura               | 0                  | 9          | 49         | 8         | 66          | 48                 |
| Cultura vigilância*       | 48                 | 140        | 557        | 83        | 828         | 250                |
| Swab queimadura           | 7                  | 33         | 93         | 0         | 133         | 96                 |
| Secreções                 | 4                  | 6          | 12         | 6         | 28          | 30                 |
| Outros materiais clínicos | 5                  | 7          | 10         | 1         | 23          | 19                 |
| <b>Total</b>              | <b>64</b>          | <b>195</b> | <b>721</b> | <b>98</b> | <b>1078</b> | <b>443</b>         |
| <b>Pacientes*</b>         | 50                 | 128        | 163        | 22        | 363         | -                  |

\* Número de pacientes com culturas positivas para *S. aureus*, alguns pacientes tem culturas positivas em anos diferentes. \*swab nasal, orofaringe e axilar de cultura de vigilância.

### AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*

#### AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*

As 1078 amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes internados no Hospital Estadual Bauru foram estudadas utilizando o método de disco-difusão com disco de oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg) e gentamicina (10 µg). Conforme os critérios do CLSI<sup>(45)</sup> as amostras que apresentaram o diâmetro do halo de inibição menor ou igual a 10 mm para o disco de oxacilina (1 µg) foram consideradas resistentes, as que apresentaram o diâmetro do halo de inibição entre 11 mm e 12 mm foram consideradas intermediárias e halo maior ou igual a 13 mm foram consideradas sensíveis. Para o disco de cefoxitina (30 µg) as amostras com o diâmetro do halo menor ou igual a 21 mm foram consideradas resistentes, e sensíveis as que apresentaram o diâmetro do halo de inibição maior ou igual a 22 mm.

Foram detectadas 810 amostras de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina – MRSA (75.1%) pelo método de disco difusão, sendo que 797 destas amostras (98.4%) apresentaram resistência detectada com disco de oxacilina (1 µg), enquanto que na utilização do método de difusão com o disco de cefoxitina (30 µg) a resistência foi detectada em 810 amostras (Tabela 3).

**Tabela 3.** Determinação de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* pela técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina (1µg) e cefoxitina (30 µg).

|            | Resistente |      | Sensível |      | Intermediário |      |
|------------|------------|------|----------|------|---------------|------|
|            | N          | %    | N        | %    | N             | %    |
| Oxacilina  | 797        | 98.4 | 280      | 25.9 | 01            | 0.09 |
| Cefoxitina | 810        | 100  | 268      | 24.9 | -             | -    |

Para os demais antibióticos testados 835 amostras (77.4%) apresentaram resistência a pelo menos 1 antibiótico (Cefoxitina – CFO - 30 µg, Oxacilina – OXA - 1µg, Vancomicina – VAN - 30 µg, Gentamicina – GEN - 10 µg, Eritromicina – ERI - 15µg), todas as amostras testadas foram sensíveis a vancomicina, sendo que 195 amostras (18.1%) foram resistentes somente a eritromicina e 505 amostras (46.8%) foram resistentes aos discos de eritromicina e gentamicina concomitantemente.

Das 810 amostras com fenótipo MRSA, 16.2% também apresentaram fenótipo de resistência somente para eritromicina e das 110 amostras com fenótipo MSSA, 12.7% das amostras apresentaram esse mesmo fenótipo. Foi observado também que 4.3% das amostras com fenótipo MRSA apresentaram perfil intermediário de resistência frente ao disco de eritromicina. O fenótipo de resistência simultânea para gentamicina e eritromicina foi observado em 64.2% das amostras com fenótipo MRSA e em apenas 2.2% das amostras com fenótipo MSSA (Tabela 4). Nenhuma das amostras incluídas no presente estudo foi resistente somente ao disco de gentamicina .

**Tabela 4:** Perfil fenotípico de resistência das amostras com fenótipo MRSA e MSSA frente aos antibióticos testados.

|                                | ERI Resistente<br>%(n) | ERI e GEN Sensível<br>%(n) | ERI Intermediário<br>%(n) | ERI + GEN Resistentes<br>%(n) |
|--------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| <b>Fenótipo MRSA<br/>n=810</b> | 16.2 (131)             | 15.3 (124)                 | 4.3 (35)                  | 64.2 (520)                    |
| <b>Fenótipo MSSA<br/>n=268</b> | 12.7 (34)              | 83.2 (223)                 | 1.8 (5)                   | 2.2 (6)                       |

GEN: Gentamicina - 10 µg, ERI: Eritromicina - 15µg

### AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*

Para a seleção das amostras submetidas à extração do ácido nucléico e posterior análise genotípica foram utilizadas os seguintes critérios: com a 1º amostra de cada paciente e em alguns casos quando houve hemocultura e cultura de vigilância dentro do mesmo período, amostras de um mesmo paciente coletadas em grande espaço de tempo,

cultura de vigilância e outro material clínico relevante do mesmo paciente, totalizando 443 amostras.

A avaliação genotípica do perfil de resistência foi realizada através da amplificação do gene *mecA* pela técnica de PCR onde foi observado que das 443 amostras testadas foi detectado o gene *mecA* em 336 amostras (75.8%) (Figura 2).



**Figura 2:** Eletroforese em Gel de Agarose para pesquisa do gene da *mecA* (533pb) pela técnica de PCR. L: Ladder 100pb; C-: Controle Negativo Cepa ATCC 25923; C+: Controle Positivo Cepa ATCC 33591; N: Controle da reação (H<sub>2</sub>O); Amostras Positivas: 7, 12, 13, 14 e 24.

Das 336 amostras *mecA* positivas 288 (85.7%) e 297 (88.4%) apresentaram fenótipo de resistência a oxacilina e cefoxitina, respectivamente, uma amostra (0,3%) apresentou fenótipo intermediário a oxacilina, 47 amostras (14%) apresentaram fenótipo de sensibilidade frente ao disco de oxacilina e 39 amostras (11.6%) frente ao disco de cefoxitina (Tabela 5).

**Tabela 5:** Presença ou ausência do gene *mecA* em cepas testadas pela técnica de disco difusão com disco de oxacilina e cefoxitina.

| PCR                   | Teste Fenotípico |     |   |                   |     |
|-----------------------|------------------|-----|---|-------------------|-----|
|                       | Oxacilina (1µg)  |     |   | Cefoxitina (30µg) |     |
|                       | S                | R   | I | S                 | R   |
| <i>mecA</i> + (N=336) | 47               | 288 | 1 | 39                | 297 |
| <i>mecA</i> - (N=107) | 107              | 0   | 0 | 107               | 0   |
| Total (N=443)         | 154              | 288 | 1 | 146               | 297 |

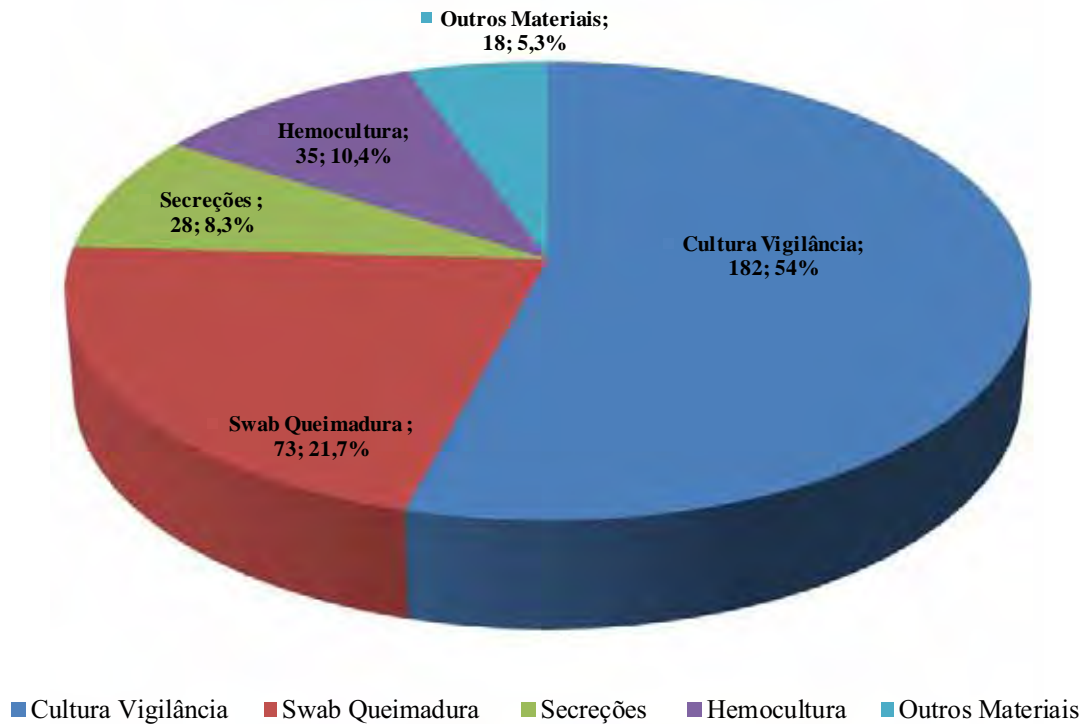
Analisando a sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos e genotípicos na determinação da resistência a oxacilina nas amostras de *S. aureus* estudadas, observou-se que, utilizando a determinação da presença do gene *mecA* como padrão ouro, a técnica de disco difusão com discos de oxacilina (1µg) e cefoxitina (30µg) apresentou 86.0% e 88.4% de sensibilidade, respectivamente e 100% de especificidade (Tabela 6).

**Tabela 6:** Determinação da sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos e genotípicos na determinação de resistência a oxacilina nas amostras de *S. aureus*.

| Teste Fenotípico        | <i>mecA</i>      |                  | Sensibilidade | Especificidade |
|-------------------------|------------------|------------------|---------------|----------------|
|                         | Positivo (N=336) | Negativo (N=107) | %             | %              |
| Disco Oxacilina (1µg)   | 289*             | 107              | 86.0          | 100            |
| Disco Cefoxitina (30µg) | 297              | 107              | 88.4          | 100            |

\*A única amostra que apresentou resultado intermediário ao disco de oxacilina foi considerada resistente.

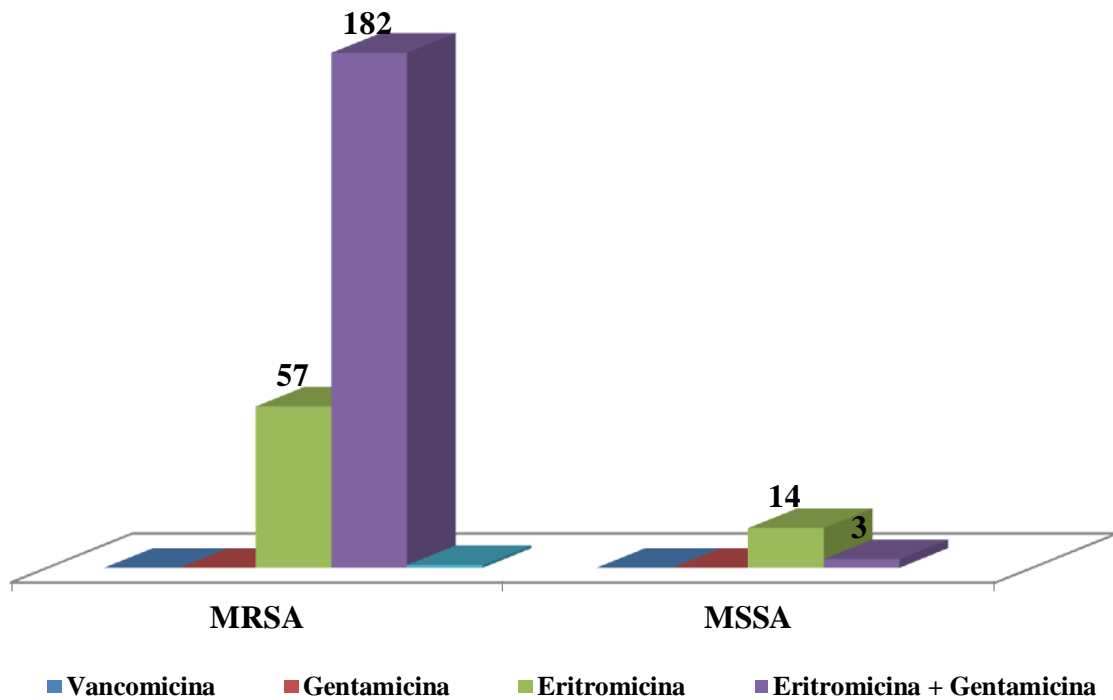
Das 336 amostras MRSA confirmadas pela presença do gene *mecA*, 35 (10.4%) foram isoladas de hemoculturas, 28 (8.3%) isoladas de secreções, 73 (21.7%) de swabs de queimadura, 182 (54.1%) de culturas de vigilância e 18 (5.3%) de outros materiais clínicos (Figura 3).



**Figura 3:** Distribuição de amostras MRSA em relação ao material clínico.

Das 336 amostras MRSA detectadas pela presença do gene *mecA*, 85 amostras (25.3%) não apresentaram resistência fenotípica detectada pela técnica de disco difusão aos antibióticos testados, por outro lado 251 amostras (74.7%) apresentaram resistência a pela menos um dos antibióticos testados, sendo que dessas, 57 amostras (22.7%) foram resistentes somente a eritromicina, 17 amostras (6.8%) apresentaram perfil intermediário de resistência para eritromicina e 182 amostras (72.5%) apresentaram resistência múltipla (gentamicina e eritromicina) (Figura 5). Das 107 amostras negativas para a presença do gene *mecA* (*Staphylococcus aureus* Sensível a Meticilina – MSSA),

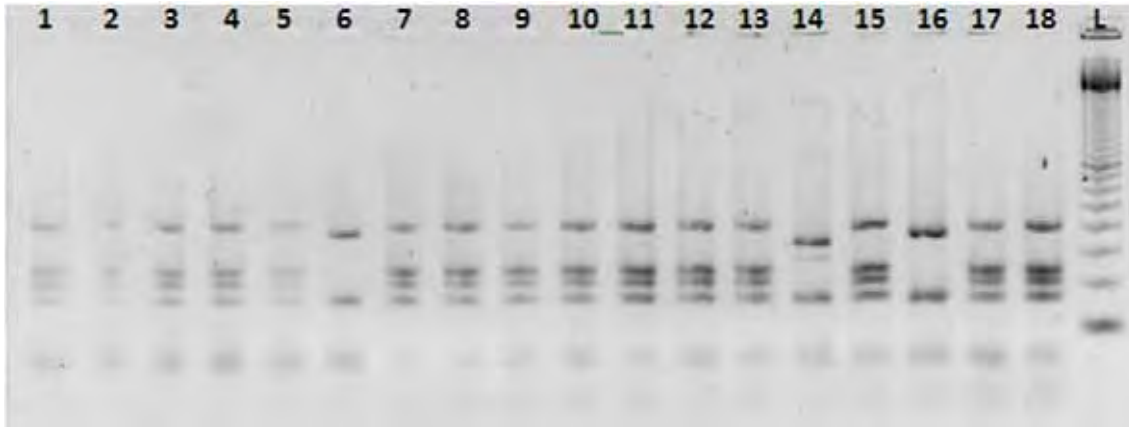
14 amostras (13.1%) apresentaram resistência somente a eritromicina, 2 amostra (1.8%) apresentou fenótipo intermediário de resistência para eritromicina e 3 amostras (2.8%) apresentaram resistência a eritromicina e gentamicina (resistência múltipla). Nenhuma das amostras MRSA ou MSSA apresentou resistência a Vancomicina (Figura 4)



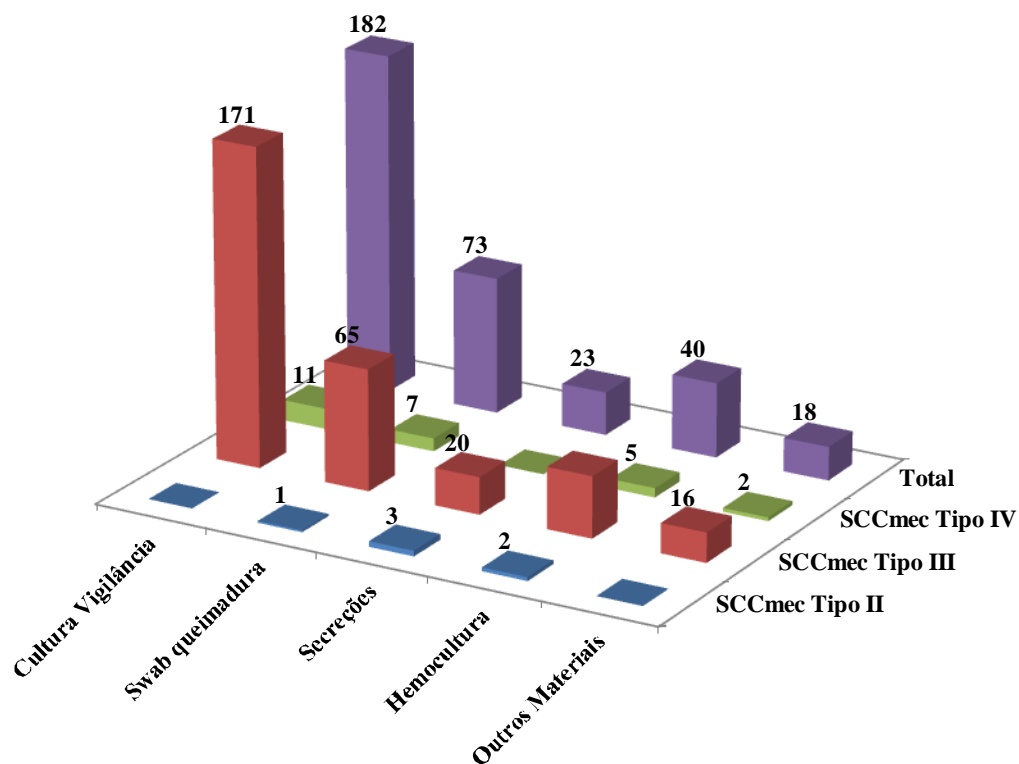
**Figura 4:** Perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas.

\* Número de amostras avaliadas pela presença do gene *mecA* testadas pela técnica de PCR

As amostras positivas pela técnica de PCR para o gene *mecA*, foram subtipadas pela técnica PCR-Multiplex conforme descrito por Oliveira e Lencastre<sup>(46)</sup> para determinação do tipo de Cassete Cromossômico Estafilocócico (*SCCmec*). Das 336 amostras testadas, 305 amostras (90.8%) apresentaram perfil *SCCmec* Tipo III ou Tipo IIIA, 6 amostras (1.8%) Tipo II e 25 amostras (7.4%) Tipo IV (Figura 5 e 6).



**Figura 5:** Eletroforese em Gel de Agarose para subtipagem do Cassete Cromossômico Estafilocócico (*SCC<sub>mec</sub>*) pela técnica de Multiplex-PCR. L: Ladder 100pb; Amostras *SCC<sub>mec</sub>* Tipo III: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18; Amostras *SCC<sub>mec</sub>* Tipo IV: 6 e 16.



**Figura 6:** Distribuição dos tipos de *SCC<sub>mec</sub>* encontrados nas amostras estudadas de acordo com material biológico.

Das 6 amostras *SCC<sub>mec</sub>* Tipo II, 3 foram provenientes de cultura de secreções, 1 swab de queimadura e de 2 hemoculturas. Em relação as 305 amostras *SCC<sub>mec</sub>* Tipo III ou Tipo IIIA, 33 amostras (10.8%) foram oriundas de hemoculturas, 171 (56%) de

cultura de vigilância, 65 (21.3%) de swabs de queimaduras, 20 (6.5 %) de secreções e 16 (5.2%) de outros materiais. A distribuição dos materiais clínicos para as 25 amostras de SCCmec tipo IV foi: 11 (44%) de culturas de vigilância, 7 (28%) de swab de queimadura e 5 (20%) de secreções e 2 (8%) de outros materiais (Figura 6 e Tabela 7).

**Tabela 7:** Características dos isolados MRSA SCCmec Tipo IV

| Característica dos isolados MRSA SCCmec tipo IV |                   |                           |                     |                  |                                 |  |
|---|-------------------|---------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|--|
| Material de coleta                              | Data <sup>1</sup> | (n° isolados)             |                     |                  |                                 | Resistência fenotípico <sup>e</sup>    |
|   |                   | Enterotoxina <sup>a</sup> | TSST-1 <sup>b</sup> | PVL <sup>c</sup> | Toxina Esfoliativa <sup>d</sup> |  |
| Secreção  | 19/jan/07         | A ; C                     | 0                   | 1                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 06/mar/07         | B                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 12/mar/07         | 0                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Secreção  | 28/mai/07         | 0                         | 0                   | 1                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 09/jul/07         | 0                         | 0                   | 0                | B                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 09/jul/07         | 0                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 16/jul/07         | 0                         | 0                   | 0                | B                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 23/jul/07         | 0                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Secreção ferida                                 | 08/dez/07         | A ; C                     | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(I), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 30/jun/08         | A ; C                     | 0                   | 1                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 07/jul/08         | C                         | 1                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 09/jul/08         | A; C                      | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 19/jul/08         | 0                         | 0                   | 0                | B                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(S), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 22/jul/08         | C                         | 1                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Bolha   | 20/ago/08         | A                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(S), VAN(S) |
| Outros Materias                                 | 27/ago/08         | 0                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Secreção  | 08/set/08         | 0                         | 1                   | 0                | B                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Outros Materias                                 | 08/set/08         | 0                         | 1                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 11/set/08         | A                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 15/set/08         | 0                         | 1                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab queimadura                                 | 15/set/08         | 0                         | 0                   | 1                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 15/set/08         | A ; C                     | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(R), GEN(R), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 15/set/08         | B                         | 0                   | 1                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 16/dez/08         | A                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |
| Swab nasal                                      | 06/jan/09         | A                         | 0                   | 0                | 0                               | OXA(R), CFO(R), ERI(S), GEN(S), VAN(S) |

<sup>1</sup> Data da coleta dia/mês/ano. <sup>a</sup> Presença dos genes *sea*, *seb* e *sec-1*. <sup>b</sup> Presença do gene *tst*. <sup>c</sup> Presença do gene *pvl*. <sup>d</sup> Presença dos genes *eta*, *etb* e *etd*. <sup>e</sup> Perfil fenotípico de resistência frente aos discos Cefoxitina – CFO - 30 µg, Oxacilina – OXA - 1µg, Vancomicina – VAN - 30 µg, Gentamicina – GEN - 10 µg, Eritromicina – ERI - 15µg. (R): resistente, (I): intermediário e (S): sensível.

Das 305 amostras *SCCmec* Tipo III ou variações 54 amostras (17.7%) apresentaram fenótipo de resistência a eritromicina, 15 amostras (4.9%) apresentaram fenótipo de resistência intermediária a eritromicina e 174 amostras (57%) apresentaram fenótipo multirresistente sendo resistentes a gentamicina e eritromicina concomitantemente. Das 25 amostras *SCCmec* tipo IV, 8% (n=2) apresentaram fenótipo de resistência a eritromicina e 32% (n=8) apresentaram fenótipo de resistência a gentamicina e eritromicina (Tabela 7).

Analisando os fatores de risco para aquisição em 15 pacientes com cultura positiva para MRSA *SCCmec* tipo IV através de um estudo caso-controle onde “caso” foram amostras MRSA *SCCmec* Tipo IV e “controle” as outras amostras MRSA (*SCCmec* Tipo III e Tipo II) foi possível observar através de uma análise univariada que a utilização de sonda vesical de demora e catéter venoso central foram significativos ( $p \leq 0.05$ ). Na análise multivariada foi possível observar que pacientes que utilizaram cateter venoso central apresentaram 0.22 vezes menos chances de adquirir MRSA *SCCmec* Tipo IV do que pacientes que não utilizaram esse dispositivo e que pacientes que fizeram uso prévio de metronidazol apresentaram 7.24 vezes mais chances de adquirir MRSA *SCCmec* Tipo IV do que pacientes que não utilizaram esse antimicrobiano (Tabela 8).

---

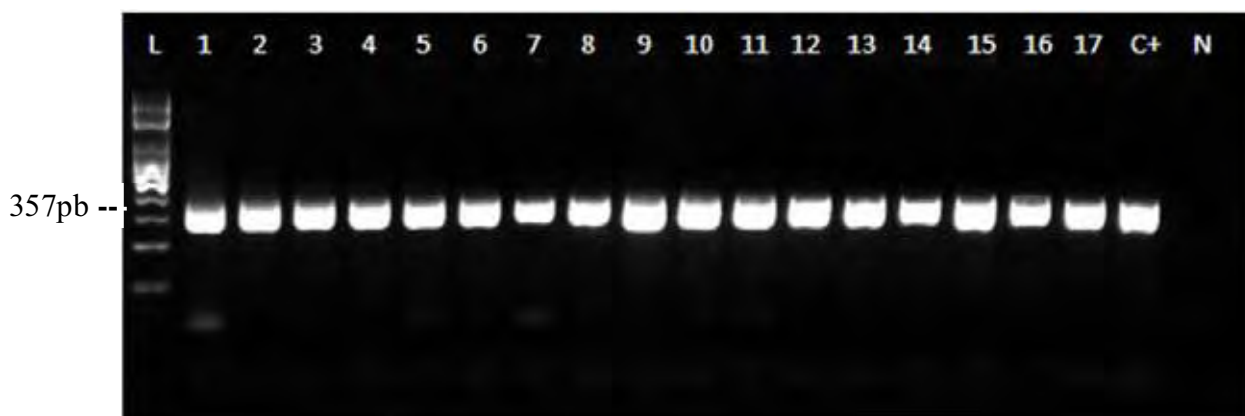
**Tabela 8:** Análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA SCCmec Tipo IV

| Fator de risco   | Univariada          |                   |                   |       | Multivariada      |      |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|------|
|  | MRSA SCCmec IV (15) | Outros MRSA (169) | OR (IC95%)        | p     | OR (IC95%)        | p    |
| <i>Dados demográficos</i>                              |                     |                   |                   |       |                   |      |
| Sexo masculino   | 10 (66.7)           | 110 (65.1)        | 1.07 (0.35-3.29)  | 0,90  |                   |      |
| Idade, média   | 41,6                | 39,5              | ...               | 0,79  |                   |      |
| <i>Comorbidades</i>                                    |                     |                   |                   |       |                   |      |
| Queimaduras  | 6 (40.0)            | 90 (53.3)         | 0.59 (0.20-1.72)  | 0,33  |                   |      |
| Doença Cardíaca  | 3 (20.0)            | 21 (12.4)         | 1.76 (0.46-6.76)  | 0,42  |                   |      |
| Doença Renal   | 3 (20.0)            | 21 (12.4)         | 1.76 (0.37-6.42)  | 0,40  |                   |      |
| Diabetes Mellitus                                      | 2 (13.3)            | 17 (10.1)         | 1.38 (0.29-6.62)  | 0,66  |                   |      |
| Doença Hepática  | 1 (6.7)             | 5 (3.0)           | 2.34 (0.26-21.47) | 0,40  |                   |      |
| Doença do SNC  | 0 (0.0)             | 20 (11.8)         | 0.0 (...)         | 0,38  |                   |      |
| Índice de Comorbidades de Charlson, mediana (variação) | 0 (0-3)             | 0 (0-6)           | ...               | 0,72  |                   |      |
| <i>Dados de internação</i>                             |                     |                   |                   |       |                   |      |
| Transferência de outro serviço                         | 6 (40.0)            | 64 (37.9)         | 1.09 (0.32-3.13)  | 0,87  |                   |      |
| Tempo de internação, mediana (variação)                | 16 (0-61)           | 11 (0-235)        | ...               | 0,31  |                   |      |
| Internação em UTI (atual ou prévia)                    | 7 (46.7)            | 88 (52.1)         | 0.81 (0.28-2.32)  | 0,69  |                   |      |
| Cirurgia   | 7 (46.7)            | 109 (64.5)        | 0.48 (0.17-1.39)  | 0,17  |                   |      |
| Ventilação Mecânica                                    | 4 (26.7)            | 77 (45.6)         | 0.43 (0.13-1.42)  | 0,16  |                   |      |
| Cateter Venoso Central                                 | 3 (20.0)            | 82 (48.5)         | 0.27 (0.07-0.97)  | 0,03  | 0.22 (0.03-0.90)  | 0,04 |
| Sonda Vesical de Demora                                | 4 (26.7)            | 91 (53.8)         | 0.31 (0.10-0.99)  | 0,04* |                   |      |
| Drenos   | 0 (0.0)             | 16 (9.5)          | 0.0 (...)         | 0,21  |                   |      |
| Úlcera de pressão                                      | 2 (13.3)            | 11 (6.5)          | 2.21 (0.44-11.04) | 0,32  |                   |      |
| Neutropenia  | 1 (6.7)             | 0 (0.0)           | ...               | 0,08  |                   |      |
| <i>Uso de antimicrobianos</i>                          |                     |                   |                   |       |                   |      |
| Oxacilina  | 6 (40.0)            | 58 (34.3)         | 1.28 (0.43-3.76)  | 0,60  |                   |      |
| Piperacilina-Tazobactam                                | 2 (13.3)            | 7 (4.1)           | 3.56 (0.67-18.91) | 0,16  |                   |      |
| Cefalotina   | 1 (6.7)             | 3 (1.8)           | 3.95 (0.39-40.54) | 0,29  |                   |      |
| Cefepima   | 5 (33.3)            | 59 (34.9)         | 0.93 (0.30-2.96)  | 0,90  |                   |      |
| Amicacina  | 2 (13.3)            | 8 (4.7)           | 3.10 (0.60-16.11) | 0,19  |                   |      |
| Ciprofloxacina   | 4 (26.7)            | 28 (16.6)         | 1.83 (0.54-6.17)  | 0,30  |                   |      |
| Levofloxacina  | 1 (6.7)             | 12 (7.1)          | 0.94 (0.11-7.72)  | 0,30  |                   |      |
| Vancomicina  | 3 (20.0)            | 25 (14.8)         | 1.44 (0.38-5.47)  | 0,71  |                   |      |
| Clindamicina   | 2 (13.3)            | 9 (5.3)           | 2.74 (0.53-14.00) | 0,22  |                   |      |
| Metronidazol   | 2 (13.3)            | 7 (4.1)           | 3.56 (0.67-18.91) | 0,16  | 7.24 (1.10-47.54) | 0,04 |
| Fluconazol   | 0 (0.0)             | 8 (4.7)           | 0.0 (...)         | 1,00  |                   |      |

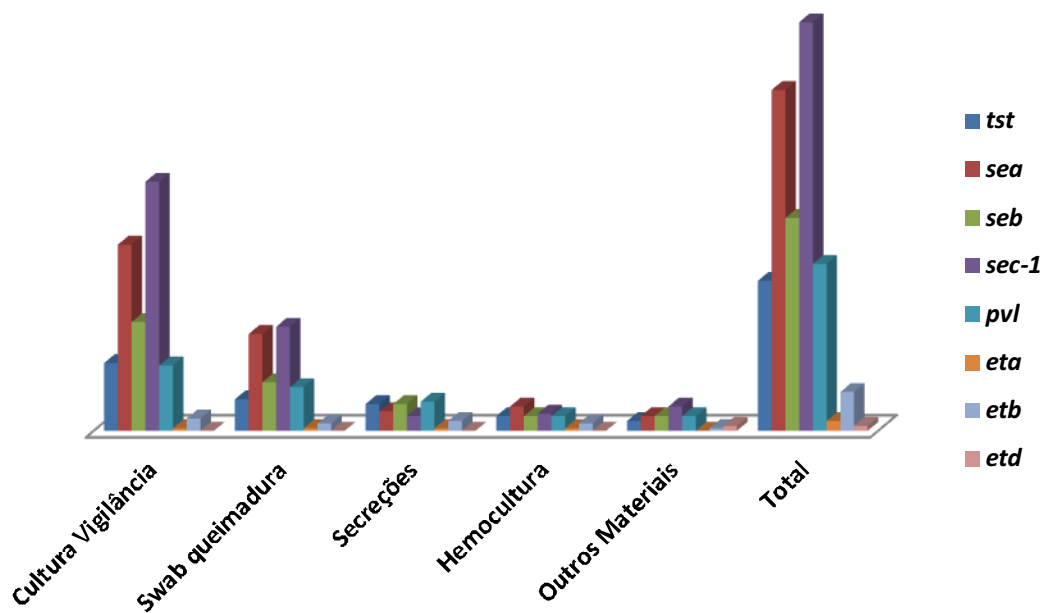
## AValiação DO PERFIL DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus*

Segundo os mesmos critérios descritos para avaliação genotípica do perfil de resistência, 443 amostras foram avaliadas quanto ao perfil genotípico de virulência pela técnica de PCR, com a detecção dos genes das enterotoxinas A, B e C (*sea*, *seb* e *sec-I*), toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina de Panton Valentine (*LukPV*), hemolisina alfa (*hla*), hemolisina delta (*hld*), toxinas esfoliativas A, B, e D (*eta*, *etb* e *etd*) e biofilme (*icaA* e *icaD*).

As 443 amostras avaliadas pela técnica de PCR para avaliação do perfil genotípico de virulência apresentaram a seguinte distribuição, 15.6% (n=69) foram positivas para o gene da Leucocidina de Panton Valentine (*lukPV*), 14% (n=62) foram positivas para gene da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*), 31.8% (n=141) positivas para gene da Enterotoxina A (*sea*), 19.8% (n=88) positivas para gene da Enterotoxina B (*seb*), 38.1% (n=169) positivas para gene da Enterotoxina C (*sec-I*), 100% (n=443) positivas para gene da Hemolisina Delta (*hld*), 99.5% (n=441) positivas para Hemolisina Alfa (*hla*), 0.9% (n=4) positivas para Toxina Esfoliativa A (*eta*), 3.6% (n=16) positivas para Toxina Esfoliativa B (*etb*) e 0.4% (n=2) positiva para Toxina Esfoliativa D (*etd*) (Figura 7 e 8). Em relação à produção de biofilme 97.5% (n=432) foram positivas para o gene *icaA* e 97% (n=430) para o gene *icaD* (Figura 11).



**Figura 7:** Eletroforese em Gel de Agarose para pesquisa do gene da hemolisina delta – *hld* (357pb) pela técnica de PCR. L: Ladder 100pb; N: Controle negativo da reação; C+: Controle Positivo N315; Amostras Positiva: 1 – 17.



**Figura 8:** Distribuição dos genes de virulência em relação ao material biológico.

A distribuição dos genes de virulência entre as 336 amostras MRSA e as 107 amostras MSSA, demonstrou que todas as amostras apresentaram algum gene de virulência estudado, sendo que destes, em todos os isolados de culturas de vigilância foi possível encontrar pelo menos um gene de virulência (Figura 8). Através de uma análise univariada foi possível verificar que a presença dos genes das enterotoxinas e o gene da Leucocidina de panton Valentine são fatores de virulência significativos para amostras MRSA (nível de significância  $p \leq 0.05$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9:** Análise da relação da presença de genes de fatores de virulência em relação a amostras MRSA/MSSA.

| Fatores de Virulência             | Amostras testadas | <i>mecA</i> (+)<br>n° (%) | <i>mecA</i> (-)<br>n° (%) | OR (IC95%)          | <i>p</i>  |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|-----------|
| <b>Genes Enterotoxinas</b>        |                   |                           |                           |                     |           |
| <i>tst</i>                        | 443               | 55 (16,3)                 | 7 (6,5)                   | 2,8 (1,23-6,34)     | 0,01*     |
| <i>sea</i>                        | 443               | 120 (35,7)                | 21 (19,6)                 | 2,27 (1,34 - 3,85)  | 0,002*    |
| <i>seb</i>                        | 443               | 75 (22,3)                 | 13 (12,1)                 | 2,07 (1,10 - 3,91)  | 0,025*    |
| <i>sec-1</i>                      | 443               | 147 (43,7)                | 22 (20,5)                 | 3,00 (1,79 - 5,03)  | < 0,0001* |
| <b>Gene Leucocidina</b>           |                   |                           |                           |                     |           |
| <i>pvl</i>                        | 443               | 61 (18,1)                 | 8 (7,5)                   | 2,74 (1,26 - 5,94)  | 0,0087*   |
| <b>Genes Toxinas Esfoliativas</b> |                   |                           |                           |                     |           |
| <i>eta</i>                        | 443               | 3 (0,9)                   | 1 (0,9)                   | 0,95 (0,09 - 9,28)  | 1         |
| <i>etb</i>                        | 443               | 14 (4,1)                  | 2 (1,9)                   | 2,28 (0,51 - 10,21) | 0,37      |
| <i>etd</i>                        | 443               | 2 (0,6)                   | 0 (0)                     | 1,60 (0,07 - 33,75) | 1         |
| <b>Genes Hemolisinas</b>          |                   |                           |                           |                     |           |
| <i>hla</i>                        | 443               | 334 (99,4)                | 107 (100)                 | 0,62 (0,02 - 13,07) | 1         |
| <i>hld</i>                        | 443               | 336 (100)                 | 107 (100)                 | -                   | -         |
| <b>Genes Produção de Biofilme</b> |                   |                           |                           |                     |           |
| <i>icaA</i>                       | 443               | 327 (97,3)                | 105 (98,1)                | 0,69 (0,14 - 3,25)  | 1         |
| <i>icaD</i>                       | 443               | 325 (96,7)                | 105 (98,1)                | 0,56 (0,12 - 2,58)  | 0,74      |

Nota: Dados estão em número (percentagem) exceto quando especificado. \* Estatisticamente significante, Nível significância  $p \leq 0.05$ . <sup>1</sup> Teste Exato de Fisher utilizado.

Em relação aos fatores de virulência foi possível observar que das 305 amostras SCC*mec* Tipo III ou IIIA, 35,4% dessas amostras foram positivas para gene da Enterotoxina A, 24% para gene da Enterotoxina B, 46% positivas para gene da Enterotoxina C, 15,4% para o gene da toxina da Síndrome do Choque Tóxico e 16,7% positivas para gene da Leucocidina de Panton Valentine. Para as 25 amostras SCC*mec* tipo IV, 40% das amostras foram positivas para o gene da enterotoxina A, 24% para o gene da enterotxina C e 8% foram positivas para o gene da Enterotoxina B, 20% para o gene da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico e para o gene da Leucocidina de Panton Valentine. Através de uma análise univariada foi possível verificar que a presença dos genes das Enterotoxinas B e C e o gene da produção de biofilme *icaA* são fatores de virulência significativos para amostras SCC*mec* Tipo III ou IIIA (nível de significância  $p \leq 0.05$ ). (Tabela 10).

A análise dos fatores de risco dos 35 pacientes com amostras MRSA pvl+ isoladas através de estudo caso-controle onde “casos” foram pacientes com MRSA pvl+ e “controle” pacientes MRSA pvl- foi possível observar através da análise univariada que a utilização de catéter venoso central e uso prévio de vancomicina ou clindamicina foram fatores de risco significativos. Na análise multivariada observou-se que pacientes que fizeram uso prévio de clindamicina apresentaram 4.29 vezes mais chances de adquirir MRSA pvl+ do que pacientes que não fizeram uso prévio desse antimicrobiano (Tabela 11).

---

**Tabela 10:** Análise da relação da presença de genes de fatores de virulência em relação as amostras *SCCmec* Tipo III e IIIA/*SCCmec* Tipo II e IV.

| Fatores de Virulência             | Amostras testadas | SCCmec Tipo III ou IIIA (n=305) |            | SCCmec Tipo II ou IV (n=31) |        | OR (IC95%) | p |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------------|---|
|                                   |                   | n° (%)                          | n° (%)     | n° (%)                      | n° (%) |            |   |
| <b>Genes Enterotoxinas</b>        |                   |                                 |            |                             |        |            |   |
| <i>Tst</i>                        | 336               | 47 (15,4)                       | 8 (25,8)   | 0,52 (0,22 - 1,24)          | 0,19   |            |   |
| <i>sea</i>                        | 336               | 108 (35,4)                      | 12 (38,7)  | 0,86 (0,40 - 1,85)          | 0,69   |            |   |
| <i>seb</i>                        | 336               | 73 (24)                         | 2 (6,4)    | 4,56 (1,06 - 19,59)         | 0,02*  |            |   |
| <i>sec-I</i>                      | 336               | 140 (46)                        | 7 (22,6)   | 2,90 (1,21 - 6,95)          | 0,01*  |            |   |
| <b>Gene Leucocidina</b>           |                   |                                 |            |                             |        |            |   |
| <i>pvl</i>                        | 336               | 51 (16,7)                       | 8 (25,8)   | 0,57 (0,24 - 1,36)          | 0,21   |            |   |
| <b>Genes Toxinas Esfoliativas</b> |                   |                                 |            |                             |        |            |   |
| <i>eta</i>                        | 336               | 3 (1)                           | 0 (0)      | 0,72 (0,03 - 14,44)         | 1      |            |   |
| <i>etb</i>                        | 336               | 10 (3,3)                        | 1 (3,8)    | 1,01 (0,12 - 8,22)          | 1      |            |   |
| <i>etd</i>                        | 336               | 2 (0,6)                         | 0 (0)      | 0,51 (0,02 - 11,05)         | 1      |            |   |
| <b>Genes Hemolisinas</b>          |                   |                                 |            |                             |        |            |   |
| <i>hla</i>                        | 336               | 303 (99,3)                      | 31 (100,0) | 1,92 (0,09 - 41,06)         | 1      |            |   |
| <i>hld</i>                        | 336               | 305 (100)                       | 31 (100)   | -                           | -      |            |   |
| <b>Genes Produção de Biofilme</b> |                   |                                 |            |                             |        |            |   |
| <i>icaA</i>                       | 336               | 299 (98)                        | 28 (90,3)  | 5,33 (1,26 - 22,52)         | 0,04*  |            |   |
| <i>icaD</i>                       | 336               | 295 (96,7)                      | 31 (100,0) | 0,44 (0,02 - 7,81)          | 0,6    |            |   |

Nota: Dados estão em número (percentagem) exceto quando especificado. \* Estatisticamente significativo, Nível significância  $p \leq 0,05$ . <sup>1</sup> Teste Exato de Fisher utilizado.

**Tabela 11:** Análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA carreando gene da Leucocidina de Panton Valentine (MRSA pvl+).

| Fator de risco                | Univariada     |                   |                   |       | Multivariada      |      |
|-------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|------|
|                               | MRSA pvl+ (34) | Outros MRSA (150) | OR (IC95%)        | p     | OR (IC95%)        | p    |
| <i>Dados demográficos</i>     |                |                   |                   |       |                   |      |
| Sexo masculino                | 24 (70.6)      | 96 (64.0)         | 1.35 (0.60-3.03)  | 0,47  |                   |      |
| Idade, média                  | 22,6           | 29,5              | ...               | 0,20  |                   |      |
| <i>Comorbidades</i>           |                |                   |                   |       |                   |      |
| Queimaduras                   | 14 (41.2)      | 82 (54.7)         | 0.58 (0.27-1.23)  | 0,16  |                   |      |
| Doença Cardíaca               | 4 (11.8)       | 20 (13.3)         | 0.87 (0.28-2.72)  | 1,00  |                   |      |
| Doença Pulmonar               | 1 (2.9)        | 3 (2.0)           | 1.49 (0.50-14.73) | 0,56  |                   |      |
| Doença Renal                  | 5 (14.7)       | 19 (12.6)         | 1.36 (0.42-3.81)  | 0,74  |                   |      |
| Diabetes Mellitus             | 6 (17.6)       | 13 (8.7)          | 2.26 (0.79-6.45)  | 0,13  |                   |      |
| Aids                          | 2 (5.9)        | 2 (1.3)           | 4.65 (0.63-34.07) | 0,16  |                   |      |
| Score de Charlson**           | 0 (0-6)        | 0 (0-2)           | ...               | 0,17  |                   |      |
| <i>Dados de internação</i>    |                |                   |                   |       |                   |      |
| Transferência***              | 14 (41.2)      | 56 (37.3)         | 1.18 (0.55-2.51)  | 0,68  |                   |      |
| Tempo de internação****       | 8 (1-79)       | 13 (1-235)        | ...               | 0,30  |                   |      |
| Internação em UTI *****       | 22 (64.7)      | 73 (48.7)         | 1.93 (0.89-4.19)  | 0,09  |                   |      |
| Cirurgia                      | 20 (58.8)      | 96 (54.0)         | 0.80 (0.38-1.72)  | 0,57  |                   |      |
| Ventilação Mecânica           | 19 (55.9)      | 62 (41.3)         | 1.80 (0.85-3.81)  | 0,12  |                   |      |
| Cateter Venoso Central        | 21 (61.8)      | 64 (42.7)         | 2.17 (1.01-4.66)  | 0,04* |                   |      |
| Sonda Vesical de Demora       | 21 (61.8)      | 74 (49.3)         | 2.66 (0.77-3.55)  | 0,19  |                   |      |
| Drenos                        | 2 (5.9)        | 14 (9.3)          | 0.61 (0.13-2.81)  | 0,74  |                   |      |
| Úlcera de pressão             | 3 (8.8)        | 10 (6.7)          | 1.36 (0.35-5.21)  | 0,71  |                   |      |
| <i>Uso de antimicrobianos</i> |                |                   |                   |       |                   |      |
| Oxacilina                     | 8 (23.5)       | 56 (37.3)         | 0.52 (0.22-1.22)  | 0,13  |                   |      |
| Amoxicilina-Clavulanato       | 0 (0.0)        | 12 (8.0)          | 0.0 (...)         | 0,13  |                   |      |
| Piperacilina-Tazobactam       | 0 (0.0)        | 9 (6.0)           | 0.0 (...)         | 0,21  |                   |      |
| Cefalotina                    | 1 (2.9)        | 3 (2.0)           | 1.46 (1.15-14.73) | 0,56  |                   |      |
| Cefepima                      | 13 (38.2)      | 51 (34.0)         | 1.20 (0.56-2.60)  | 0,64  |                   |      |
| Imipenem                      | 7 (20.6)       | 18 (12.0)         | 1.90 (0.72-5.00)  | 0,26  |                   |      |
| Meropenem                     | 1 (2.9)        | 2 (1.3)           | 2.24 (0.20-25.47) | 0,46  |                   |      |
| Gentamicina                   | 1 (2.9)        | 3 (2.0)           | 1.46 (1.15-14.73) | 0,56  |                   |      |
| Polimixina B                  | 1 (2.9)        | 2 (1.3)           | 2.24 (0.20-25.47) | 0,46  |                   |      |
| Vancomicina                   | 9 (26.5)       | 19 (12.7)         | 2.48 (1.01-6.11)  | 0,04* |                   |      |
| Clindamicina                  | 5 (14.7)       | 6 (4.0)           | 4.14 (1.18-14.97) | 0,03  | 4.29 (1.22-15.02) | 0,02 |
| Fluconazol                    | 2 (5.9)        | 6 (4.0)           | 1.50 (0.29-7.78)  | 0,64  |                   |      |

A análise univariada dos fatores de virulência relacionados com a capacidade de invasão de *S. aureus* através da comparação dos fatores de virulência das amostras

isoladas de culturas clínicas (84) e de vigilância (225) mostrou que a presença de SCCmec Tipo II, Tipo III, Tipo IV, genes da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*), Esfoliatina B (*etb*) e o gene da Leucocidina de Pantone Valentine (*pvl*) foram fatores de virulência significativos ( $p \leq 0.05$ ). Já na análise multivariada foi possível observar que amostras MRSA com SCCmec Tipo III foram 2.19 vezes mais invasivas que as demais amostras MRSA e amostras com SCCmec Tipo IV 5.28 vezes mais invasivas que as demais amostras MRSA. Também foi possível observar que amostras de *S. aureus* que carregam gene da Toxina Esfoliatina B (*etb*) podem ser 6.38 vezes mais invasivas, da mesma forma que amostras que carregam gene da Leucocidina de Pantone Valentine (*pvl*) podem ser 2.38 vezes mais invasivas que as demais amostras de *S. aureus* (Tabela 12).

**Tabela 12:** Análise dos fatores relacionados à invasividade de amostras *S. aureus*

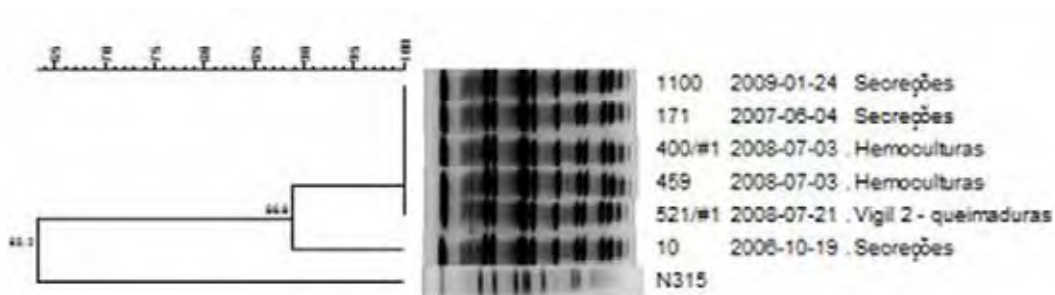
| Genes                        | Univariada             |                              |                            |              | Multivariada             |             |
|------------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------|--------------------------|-------------|
|                              | Culturas Clínicas (84) | Culturas de Vigilância (225) | OR (95%CI)                 | P            | OR (95%CI)               | P           |
| <b>SCCmec</b>                |                        |                              |                            |              |                          |             |
| <b>Ausência (referencia)</b> | 14 (16.7)              | 75 (33.3)                    | referência                 | ...          | referência               | ...         |
| <b>Tipo II</b>               | 4 (4.8)                | 1 (0.4)                      | <b>21.43 (2.22-206.26)</b> | <b>0,004</b> | 10.8 (0.95-122.14)       | 0,06        |
| <b>Tipo III</b>              | 59 (70.2)              | 44 (19.6)                    | <b>2.19 (1.15-4.18)</b>    | <b>0,02</b>  | <b>2.19 (1.08-4.45)</b>  | <b>0,03</b> |
| <b>Tipo IV</b>               | 7 (8.3)                | 5 (2.2)                      | <b>7.50 (2.08-27.02)</b>   | <b>0,003</b> | <b>5.28 (1.35-20.63)</b> | <b>0,02</b> |
| <b>Genes de Virulencia</b>   |                        |                              |                            |              |                          |             |
| <i>tst</i>                   | 19 (22.6)              | 28 (12.4)                    | <b>2.06 (1.08-3.93)</b>    | <b>0,03</b>  | 1.36 (0.65-2.84)         | 0,41        |
| <i>sea</i>                   | 20 (23.8)              | 60 (26.7)                    | 0.86 (0.38-1.54)           | 0,61         | 1.16 (0.57-2.33)         | 0,69        |
| <i>seb</i>                   | 22 (26.2)              | 43 (19.1)                    | 1.50 (0.83-2.71)           | 0,17         | 1.64 (0.85-3.16)         | 0,14        |
| <i>sec1</i>                  | 20 (23.8)              | 75 (33.3)                    | 0.63 (0.34-1.11)           | 0,11         | 0.55 (0.27-1.10)         | 0,09        |
| <i>eta</i>                   | 2 (2.4)                | 1 (0.4)                      | 5.46 (0.49-61.06)          | 0,18         | 3.57 (1.48-27.46)        | 0,32        |
| <b><i>etb</i></b>            | <b>8 (9.5)</b>         | <b>4 (1.8)</b>               | <b>5.82 (1.70-19.86)</b>   | <b>0,002</b> | <b>6.38 (1.48-27.46)</b> | <b>0,01</b> |
| <i>etd</i>                   | 2 (2.4)                | 0 (0.0)                      | indefinido                 | 0,07         | indefinido*              | 0,99        |
| <b><i>pvl</i></b>            | <b>21 (25.0)</b>       | <b>25 (11.1)</b>             | <b>2.67 (1.40-5.09)</b>    | <b>0,002</b> | <b>2.38 (1.16-4.86)</b>  | <b>0,02</b> |
| <i>ica A</i>                 | 80 (95.2)              | 220 (97.8)                   | 0.46 (0.12-1.74)           | 0,26         | 0.71 (0.14-3.71)         | 0,69        |
| <i>ica D</i>                 | 84 (100.0)             | 216 (96.0)                   | indefinido                 | 0,12         | indefinido*              | 0,99        |
| <i>hla</i>                   | 84 (100.0)             | 223 (99.1)                   | indefinido                 | 1,00         | indefinido*              | 0,99        |
| <i>hld</i>                   | 84 (100.0)             | 225 (100.0)                  | indefinido                 | 1,00         | NI**                     | NI**        |

Nota. Casos estão em números (%). Resultados significativos estão em negrito. Todas as variáveis são dicotômicas exceto SCCmec (que foi analisada como uma variável "dummy" com ausência de uma categoria de referência). OR, Odds Ratio. CI, Confidence Interval. \* CI variando de zero ao infinito. \*\*NI: Não incluído devido a presença em todos os casos.

## DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLONAL DAS AMOSTRAS MRSA

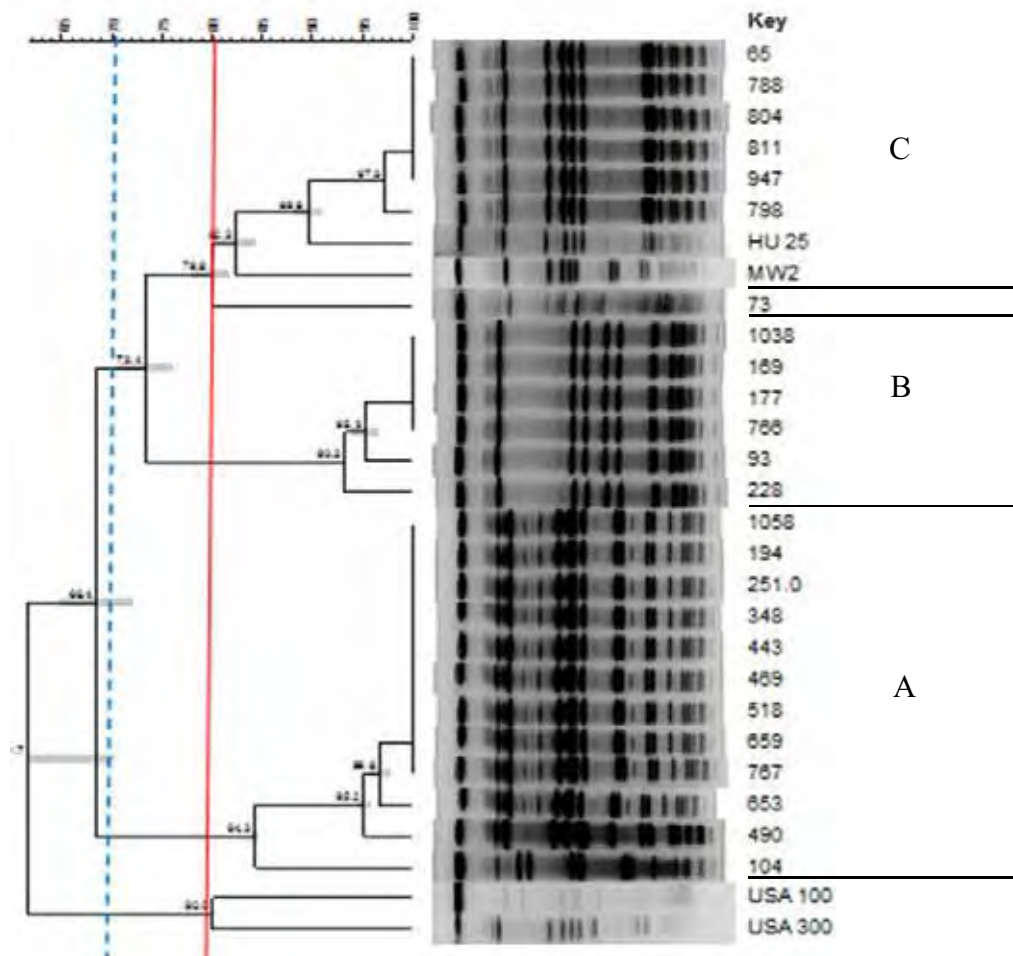
Para a determinação do perfil clonal das amostras MRSA foi utilizada a técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE com a enzima *SmaI*. Para isso foi realizada uma padronização baseada nos protocolos de Chung et al e Pfaller<sup>(53,54)</sup>. Foram tipadas por essa técnica 443 amostras utilizando para análise o coeficiente de Sorensen-Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) com otimização de 1.5 e tolerância 2.0, considerando para análise valores de similaridade  $S_{ab} \geq 80$ .

Analisando o perfil clonal das amostras SCCmec Tipo II foi possível observar que os isolados foram agrupados em um único grupo apresentando uma similaridade de 88.9% e foram isolados dos pacientes de 2006 a 2009 demonstrando ser um clone persistente, isolado tanto de cultura de vigilância, secreções e hemoculturas (Figura 12).



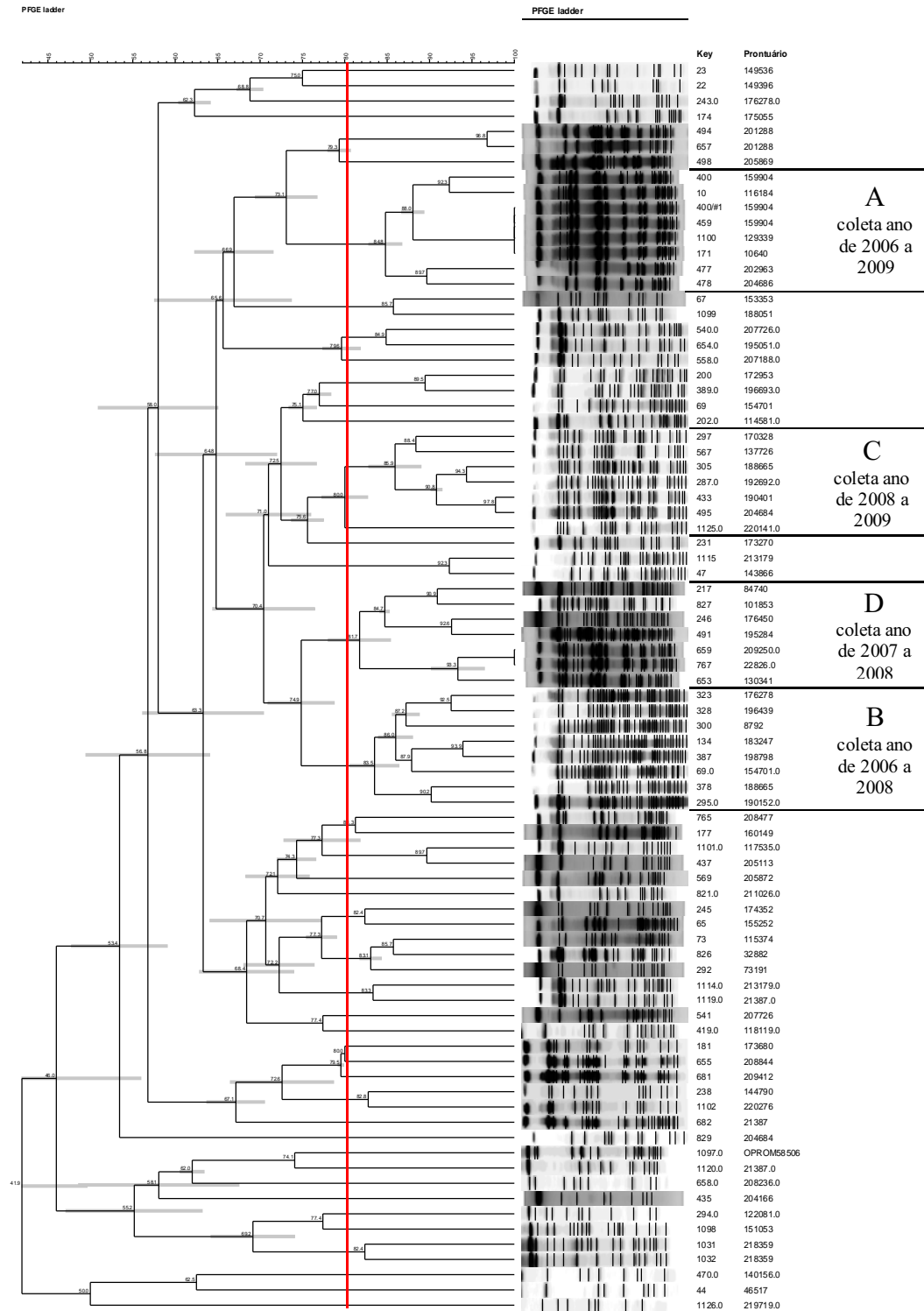
**Figura 12:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* dos 6 isolados MRSA SCCmec tipo II (similaridade  $\geq 80\%$ ). N315: Cepa SCCmec Tipo II.

A análise do perfil clonal das amostras SCCmec Tipo IV utilizando similaridade de 80% resultou na formação de 3 grupos majoritários, sendo que desses o maior agrupou 12 isolados (Figura 13).



**Figura 13:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* dos 25 isolados MRSA SCCmec tipo IV (similaridade  $\geq 70\%$  e  $\geq 80\%$ ).

Analisando o perfil clonal das amostras MRSA invasivas (isoladas de materiais clínicos) foi possível observar a presença de 4 grupos clonais majoritários, sendo que os grupos A (84.8%) e B (83.5%) agruparam 8 isolados cada um e os grupos C (85.9%) e D (81.7%) agruparam 7 isolados cada um, e que nos quatro grupos majoritários foi possível notar que esse perfil clonal tem persistido no ambiente por mais de um ano (Fig. 14). Analisando as características dos isolados agrupados nesses 4 grupos majoritários observou-se um perfil enterotoxigênico importante, e também foi possível notar que o grupo A agrupou isolados SCCmec Tipo II e que o Grupo D agrupou isolados SCCmec Tipo IV (Tabela 13).



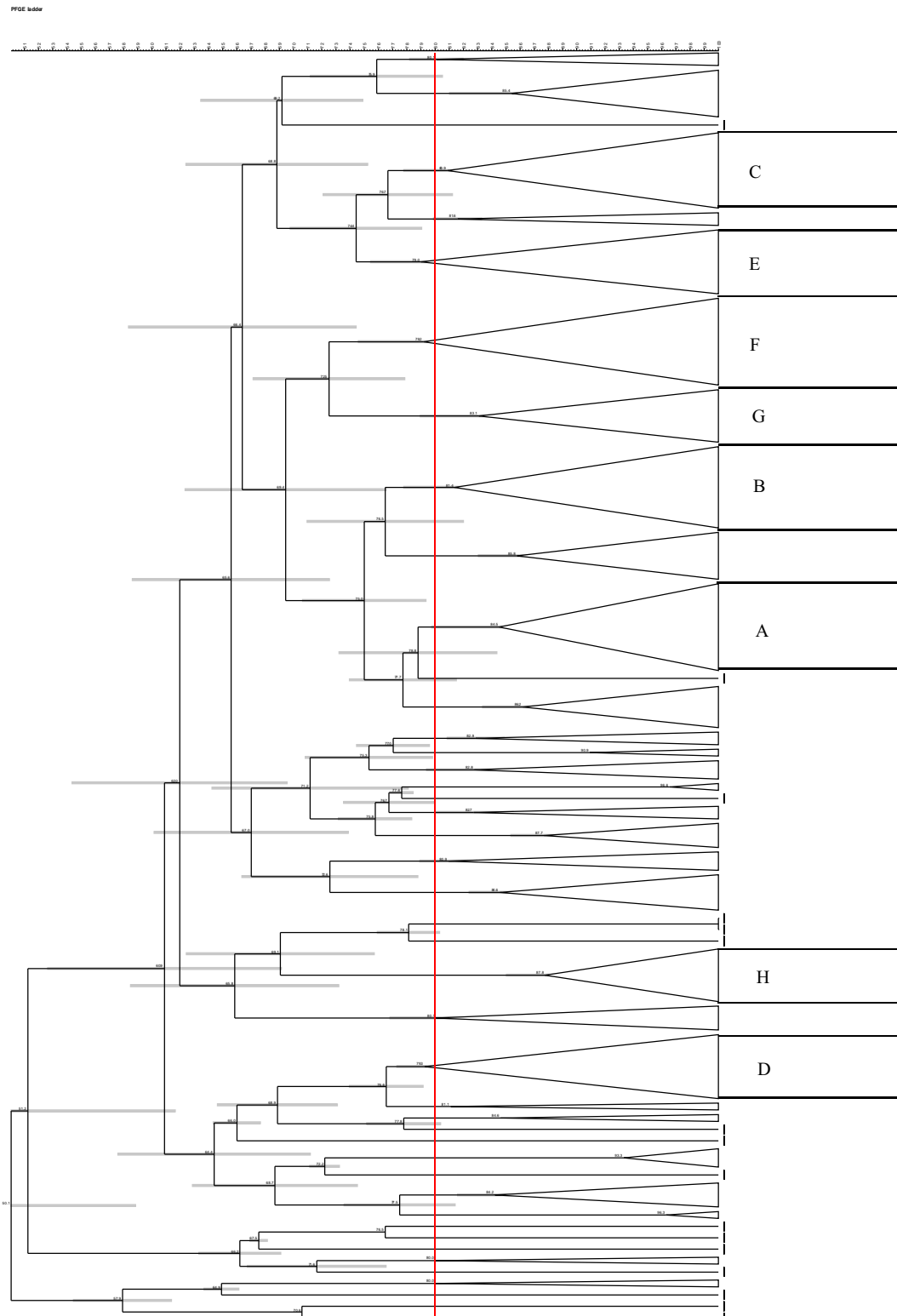
**Figura 14:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de 82 isolados MRSA invasivos (culturas clínicas) (similaridade  $\geq 80\%$ ).

**Tabela 13:** Características dos clones MRSA invasivos.

| Padrão PFGE<br>(coeficiente<br>similaridade) <sup>1</sup> | Nº<br>isolados | Característica do clone<br>(nº isolados) |                           |                     |                  |                                    |                         | Produção biofilme                 |
|---|----------------|--|---------------------------|---------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|   |                | Tipo SCCmec                              | Enterotoxina <sup>a</sup> | TSST-1 <sup>b</sup> | PVL <sup>c</sup> | Toxina<br>Esfoliativa <sup>d</sup> | Hemolisina <sup>e</sup> |                                   |
| Grupo A (S <sub>ab</sub> 84.8)                            | 8              | II(6); IIIA(2)                           | A (1); B (1);<br>C (2)    | 1                   | 4                | B (1)                              | Alfa e Delta<br>(8)     | <i>icaA</i> (6) e <i>icaD</i> (8) |
| Grupo B (S <sub>ab</sub> 83.5)                            | 8              | III(4); IIIA(4)                          | B (1)                     | 1                   | 2                | B (2)                              | Alfa e Delta<br>(8)     | <i>icaA</i> (8) e <i>icaD</i> (7) |
| Grupo C (S <sub>ab</sub> 85.9)                            | 7              | III(3); IIIA(4)                          | A(2); C(2)                | 2                   | 2                | 0                                  | Alfa e Delta<br>(7)     | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (7)     |
| Grupo D (S <sub>ab</sub> 81.7)                            | 7              | III(2); IIIA(2);<br>IV(3)                | A (2); B (1);<br>C (1)    | 2                   | 2                | 0                                  | Alfa e Delta<br>(7)     | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (7)     |

<sup>1</sup> coeficiente de similaridade analisado com *cutoff* 70% utilizando Dice/UPGMA. <sup>a</sup> Presença dos genes *sea*, *seb* e *sec-1*. <sup>b</sup> Presença do gene *tsst*. <sup>c</sup> Presença do gene *pvl*. <sup>d</sup> Presença dos genes *eta*, *etb* e *etd*. <sup>e</sup> Presença dos genes *hla* e *hld*.

A análise do perfil clonal das amostras colonizantes (culturas de vigilância) demonstrou a presença de 7 clones majoritários: A (16 isolados agrupados com S<sub>ab</sub> 84.5), B (15 isolados agrupados com S<sub>ab</sub> 81.4), C (14 isolados agrupados com S<sub>ab</sub> 80.9) e D (11 isolados agrupados com S<sub>ab</sub> 82.5). Os grupos E (S<sub>ab</sub> 89.9), F (S<sub>ab</sub> 86.7), G (S<sub>ab</sub> 83.1) e H (S<sub>ab</sub> 87.8) agruparam 10 isolados cada. Em todos os grupos majoritários foi possível observar a presença de isolados coletados em anos diferentes, demonstrando que esses clones persistiram nesse ambiente. Analisando as características dos isolados agrupados nos grupos majoritários foi possível observar que o Grupo D agrupou a maioria dos isolados SCCmec Tipo IV (Fig. 15 e Tabela 14).



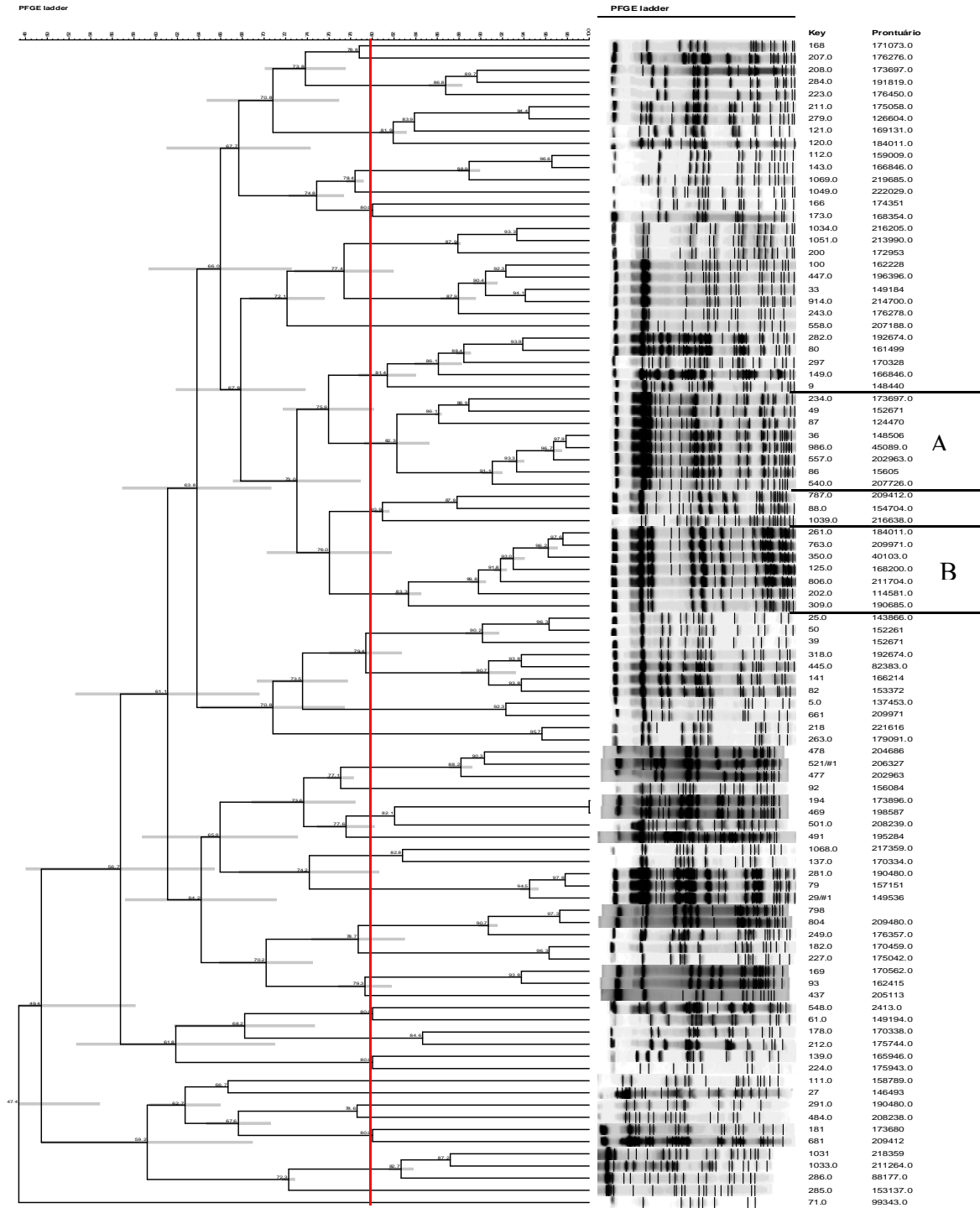
**Figura 15:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de 254 isolados MRSA colonizantes (culturas de vigilância) (similaridade  $\geq 80\%$ ).

**Tabela 14:** Características dos clones MRSA colonizantes.

| Padrão PFGE<br>(coeficiente<br>similaridade) <sup>1</sup> | Característica do clone |                              |                           |                     |                  |                                    |                            |                                     |
|---|-------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
|   | (n° isolados)           |                              |                           |                     |                  |                                    |                            |                                     |
|   | N°<br>isolados          | Tipo<br>SCCmec               | Enterotoxina <sup>a</sup> | TSST-1 <sup>b</sup> | PVL <sup>c</sup> | Toxina<br>Esfoliativa <sup>d</sup> | Hemolisina<br><sup>e</sup> | Produção biofilme                   |
| Grupo A (S <sub>ab</sub> 84.5)                            | 16                      | III(12);<br>IIIA(4)          | A (4); B (3);<br>C (5)    | 4                   | 3                | B (1)                              | Alfa e Delta<br>(16)       | <i>icaA</i> (15) e <i>icaD</i> (16) |
| Grupo B (S <sub>ab</sub> 81.4)                            | 15                      | III(12);<br>IIIA(3)          | A (7); B (6);<br>C (8)    | 0                   | 2                | B (2)                              | Alfa e Delta<br>(15)       | <i>icaA</i> (14) e <i>icaD</i> (15) |
| Grupo C (S <sub>ab</sub> 80.9)                            | 14                      | III(9);<br>IIIA(5)           | A(6); B(6);<br>C(5)       | 3                   | 2                | 0                                  | Alfa e Delta<br>(14)       | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (14)      |
| Grupo D (S <sub>ab</sub> 82.5)                            | 11                      | II(1);<br>IV(10)             | A (4); B (1);<br>C (4)    | 3                   | 1                | 0                                  | Alfa e Delta<br>(11)       | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (11)      |
| Grupo E (S <sub>ab</sub> 89.9)                            | 10                      | III(8);<br>IIIA(1);<br>IV(1) | A(6); B(2);<br>C(6)       | 3                   | 1                | 0                                  | Alfa e Delta<br>(10)       | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (10)      |
| Grupo F (S <sub>ab</sub> 86.7)                            | 10                      | III(7);<br>IIIA(3)           | A(2); B(2);<br>C(5)       | 0                   | 1                | B(1)                               | Alfa e Delta<br>(10)       | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (10)      |
| Grupo G (S <sub>ab</sub> 83.1)                            | 10                      | III(6);<br>IIIA(4)           | A(7); B(2);<br>C(5)       | 2                   | 1                | B(1)                               | Alfa e Delta<br>(10)       | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (10)      |
| Grupo H (S <sub>ab</sub> 87.8)                            | 10                      | III(7);<br>IIIA(3)           | A(4); B(1);<br>C(7)       | 0                   | 2                | 0                                  | Alfa e Delta<br>(10)       | <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (10)      |

<sup>1</sup> coeficiente de similaridade analisado com *cuttoff* 70% utilizando Dice/UPGMA. <sup>a</sup> Presença dos genes *sea*, *seb* e *sec-1*. <sup>b</sup> Presença do gene *tst*. <sup>c</sup> Presença do gene *pvl*. <sup>d</sup> Presença dos genes *eta*, *etb* e *etd*. <sup>e</sup> Presença dos genes *hla* e *hld*.

O perfil clonal dos MRSA isolados de pacientes queimados demonstrou 2 grupos majoritários: Grupo A (8 isolados agrupados com S<sub>ab</sub> 82.3) e Grupo B (7 isolados agrupados com S<sub>ab</sub> 83.3). Analisando as características desses isolados foi possível observar que ambos os grupos majoritários agruparam amostras SCCmec Tipo III ou IIIA e com um perfil menos toxigênico se comparado aos demais isolados analisados no presente estudo (Fig. 16 e Tabela 15).



**Figura 16:** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de 96 isolados MRSA de pacientes queimados (similaridade  $\geq 80\%$ ).

**Tabela 15:** Características dos clones MRSA isolados de pacientes queimados.

| Característica do clone                                   |             |                    |                           |                     |                  |                                 |                         |                                  |
|---|-------------|--------------------|---------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| (n° isolados)   |             |                    |                           |                     |                  |                                 |                         |                                  |
| Padrão PFGE<br>(coeficiente de similaridade) <sup>1</sup> | N° isolados | Tipo SCCmec        | Enterotoxina <sup>a</sup> | TSST-1 <sup>b</sup> | PVL <sup>c</sup> | Toxina Esfoliativa <sup>d</sup> | Hemolisina <sup>e</sup> | Produção biofilme                |
| Grupo A (S <sub>ab</sub> 82.3)                            | 8           | III(7);<br>IIIA(1) | A (1); B (3);<br>C (1)    | 2                   | 0                | 0                               | Alfa e Delta<br>(8)     | <i>icaA</i> e <i>icaD</i><br>(8) |
| Grupo B (S <sub>ab</sub> 83.3)                            | 7           | III(4);<br>IIIA(3) | A (2); B (2);<br>C (4)    | 1                   | 1                | 0                               | Alfa e Delta<br>(7)     | <i>IcaA</i> e <i>icaD</i><br>(7) |

<sup>1</sup> coeficiente de similaridade analisado com *cutoff* 70% utilizando Dice/UPGMA. <sup>a</sup> Presença dos genes *sea*, *seb* e *sec-1*. <sup>b</sup> Presença do gene *tst*. <sup>c</sup> Presença do gene *pvl*. <sup>d</sup> Presença dos genes *eta*, *etb* e *etd*. <sup>e</sup> Presença dos genes *hla* e *hld*.

## ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE MRSA

Foram avaliados prontuários de 88 pacientes não queimados através de um estudo caso-controle, onde “casos” foram os pacientes com cultura positiva para MRSA e “controles” pacientes sem cultura positiva para MRSA. Foram analisados dados demográficos, comorbidades, dados de internação, imunidade, procedimentos e dispositivos e uso de antimicrobianos (Tabela 16).

Através de uma análise univariada observou-se que o uso de esteróides e uso prévio de cefazolina e fluconazol, apresentaram nível de significância ( $p \leq 0.05$ ), da mesma forma que ter se submetido a cirurgia e a presença de úlceras de pressão. Posteriormente os fatores de risco foram submetidos à análise multivariada, sendo o critério de seleção para inclusão no modelo os fatores que apresentaram  $p < 0.2$  na análise univariada. Os resultados obtidos no modelo de regressão logística revelaram como fatores significativos para aquisição de MRSA ter sido submetido a cirurgia com 3.01 vezes mais chances de adquirir MRSA e pacientes que apresentaram úlcera de pressão, com 11.44 vezes mais chances de adquirir MRSA. Por outro lado, o uso de vancomicina exerceu efeito protetor, sendo que pacientes que utilizaram previamente vancomicina apresentaram 0.33 vezes menos chances de adquirir MRSA em relação a pacientes que não utilizaram vancomicina previamente (Tabela 16).

Para estudo e identificação dos fatores de risco para aquisição de MSSA em pacientes não queimados foram avaliados prontuários de 37 pacientes que apresentaram cultura positiva para *S. aureus* para um estudo caso-controle, onde “casos” foram os pacientes com cultura positiva para MSSA e “controles” sem cultura positiva para *Staphylococcus aureus*. Tanto através de uma análise univariada quanto multivariada observou-se que pacientes do sexo masculino tem 0.4 menos chances de adquirir MSSA do que pacientes do sexo feminino e que pacientes com internação prévia ou atual em UTI tem 4.64 mais chances de adquirir MSSA em relação aos pacientes que não foram internados em UTI (Tabela 17).

---

**Tabela 16:** Análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA isolados de pacientes não queimados

| Fator de risco                | Univariada       |                  |                          |               | Multivariada              |              |
|-------------------------------|------------------|------------------|--------------------------|---------------|---------------------------|--------------|
|                               | Casos MRSA (88)  | Controles (125)  | OR (IC95%)               | p             | OR (IC95%)                | p            |
| <i>Dados demográficos</i>     |                  |                  |                          |               |                           |              |
| Sexo masculino                | 57 (64.8)        | 80 (64.0)        | 1.03 (0.59-1.83)         | 0,91          |                           |              |
| Idade, média                  | 51,8             | 53,8             | ...                      | 0,57          |                           |              |
| <i>Comorbidades</i>           |                  |                  |                          |               |                           |              |
| Doença Cardíaca               | 22 (25.3)        | 34 (27.2)        | 0.91 (0.49-1.69)         | 0,76          |                           |              |
| Doença Pulmonar               | 2 (2.3)          | 9 (7.2)          | 0.30 (0.06-1.44)         | 0,09          |                           |              |
| Doença Renal                  | 24 (27.2)        | 26 (20.8)        | 1.43 (0.75-2.70)         | 0,27          |                           |              |
| Diabetes Mellitus             | 18 (20.7)        | 25 (20.0)        | 1.04 (0.53-2.06)         | 0,9           |                           |              |
| Neoplasia Sólida              | 4 (4.6)          | 13 (10.4)        | 0.42 (0.13-1.32)         | 0,13          |                           |              |
| Aids                          | 2 (2.3)          | 4 (4.2)          | 0.71 (0.13-3.90)         | 1,00          |                           |              |
| Score Charlson**              | 1 (0-6)          | 1 (0-6)          | ...                      | 0,84          |                           |              |
| <i>Dados de internação</i>    |                  |                  |                          |               |                           |              |
| Transferência***              | 26 (29.9)        | 41 (32.8)        | 0.88 (0.48-1.58)         | 0,65          |                           |              |
| Tempo de internação****       | 7.5 (0-235)      | 12 (0-144)       | ...                      | 0,06          |                           |              |
| Internação em UTI *****       | 56 (63.6)        | 63 (50.4)        | 1.72 (0.99-3.01)         | 0,06          |                           |              |
| <b>Cirurgia</b>               | <b>49 (55.7)</b> | <b>46 (37.1)</b> | <b>2.13 (1.22-3.72)</b>  | <b>0.007*</b> | <b>3.01 (1.60-5.07)</b>   | <b>0,001</b> |
| Ventilação Mecânica           | 46 (52.3)        | 52 (41.9)        | 1.52 (0.87-2.63)         | 0,13          |                           |              |
| Cateter Venoso Central        | 47 (53.4)        | 54 (42.5)        | 1.48 (0.86-2.57)         | 0,16          |                           |              |
| Sonda Vesical de Demora       | 49 (55.7)        | 63 (51.6)        | 1.18 (0.68-2.04)         | 0,56          |                           |              |
| Drenos                        | 8 (9.1)          | 18 (14.5)        | 0.59 (0.24-1.42)         | 0,23          |                           |              |
| <b>Úlcera de pressão</b>      | <b>13 (6.1)</b>  | <b>4 (1.9)</b>   | <b>5.20 (1.64-16.54)</b> | <b>0.002*</b> | <b>11.44 (2.33-56.11)</b> | <b>0,003</b> |
| <b>Esteróides</b>             | <b>0 (0.0)</b>   | <b>7 (5.6)</b>   | <b>0.0 (...)</b>         | <b>0.02*</b>  |                           |              |
| <i>Uso de antimicrobianos</i> |                  |                  |                          |               |                           |              |
| Oxacilina                     | 15 (17.0)        | 15 (12.0)        | 1.51 (0.70-3.27)         | 0,3           |                           |              |
| Amoxicilina-Clavulanato       | 6 (6.8)          | 15 (12.1)        | 0.53 (0.20-1.43)         | 0,2           |                           |              |
| Piperacilina-Tazobactam       | 7 (8.0)          | 11 (8.9)         | 0.89 (0.33-2.39)         | 0,81          |                           |              |
| Cefalotina                    | 4 (4.5)          | 4 (3.2)          | 1.43 (0.35-5.87)         | 0,44          |                           |              |
| <b>Cefazolina</b>             | <b>0 (0.0)</b>   | <b>6 (2.8)</b>   | <b>0.0 (...)</b>         | <b>0.04*</b>  |                           |              |
| Ceftriaxona                   | 0 (0.0)          | 5 (2.3)          | 0.0 (...)                | 0,08          |                           |              |
| Cefepima                      | 25 (28.4)        | 36 (28.8)        | 0.98 (0.54-1.79)         | 0,95          |                           |              |
| Imipenem                      | 10 (11.4)        | 17 (13.6)        | 0.81 (0.35-1.88)         | 0,69          |                           |              |
| Ciprofloxacina                | 17 (19.3)        | 17 (13.6)        | 1.52 (0.73-3.18)         | 0,26          |                           |              |
| Levofloxacina                 | 9 (10.2)         | 12 (9.6)         | 1.07 (0.43-2.67)         | 0,88          |                           |              |
| <b>Vancomicina</b>            | <b>14 (15.9)</b> | <b>31 (24.8)</b> | <b>0.57 (0.29-1.16)</b>  | <b>0,12</b>   | <b>0.33 (0.14-0.78)</b>   | <b>0,01</b>  |
| Clindamicina                  | 10 (11.4)        | 8 (6.4)          | 1.88 (0.71-4.96)         | 0,2           |                           |              |
| <b>Fluconazol</b>             | <b>2 (2.3)</b>   | <b>13 (10.4)</b> | <b>0.20 (0.04-0.91)</b>  | <b>0.02*</b>  |                           |              |

Nota: Dados estão em número(percentagem) exceto quando especificado. Nível significância  $p \leq 0.05$ . Análise Multivariada  $p < 0.2$ .

\* Estatisticamente significativa. \*\* Índice de Comorbidades de Charlson, mediana (variação). \*\*\* Transferência de outro serviço.

\*\*\*\* Tempo de internação, mediana (variação). \*\*\*\*\*Internação em UTI (atual ou prévia).

**Tabela 17:** Análise dos fatores de risco para aquisição de MSSA isolados de pacientes não queimados

| Fator de risco                | Univariada      |                 |                   | Multivariada |                   |       |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------|-------------------|-------|
|                               | Casos MSSA (37) | Controles (125) | OR (IC95%)        | P            | OR (IC95%)        | p     |
| <i>Dados demográficos</i>     |                 |                 |                   |              |                   |       |
| Sexo masculino                | 15 (40.7)       | 80 (64.0)       | 0.38 (0.18-0.81)  | 0,01*        | 0.34 (0.15-0.75)  | 0,007 |
| Idade, média                  | 56,3            | 53,8            | ...               | 0,66         |                   |       |
| <i>Comorbidades</i>           |                 |                 |                   |              |                   |       |
| Doença Cardíaca               | 8 (21.6)        | 34 (27.2)       | 0.74 (0.31-1.77)  | 0,5          |                   |       |
| Doença Pulmonar               | 6 (16.2)        | 9 (7.2)         | 2.50 (0.84-7.54)  | 0,11         |                   |       |
| Doença Renal                  | 8 (21.6)        | 26 (20.8)       | 1.05 (0.41-2.53)  | 0,91         |                   |       |
| Diabetes Mellitus             | 9 (24.3)        | 25 (20.0)       | 1.29 (0.54-3.07)  | 0,57         |                   |       |
| Aids                          |                 |                 |                   |              |                   |       |
| Score de Charlson**           | 1 (0-6)         | 1 (0-6)         | ...               | 0,72         |                   |       |
| <i>Dados de internação</i>    |                 |                 |                   |              |                   |       |
| Transferência***              | 10 (27.0)       | 41 (32.8)       | 0.76 (0.34-1.72)  | 0,55         |                   |       |
| Tempo de internação****       | 12 (0-68)       | 12 (0-144)      | ...               | 0,42         |                   |       |
| Internação em UTI *****       | 30 (81.1)       | 63 (50.4)       | 4.22 (1.63-10.32) | 0,001*       | 4.64 (1.88-11.63) | 0,001 |
| Cirurgia                      | 17 (45.9)       | 46 (37.1)       | 1.44 (0.69-3.03)  | 0,33         |                   |       |
| Ventilação Mecânica           | 22 (59.5)       | 52 (41.9)       | 2.06 (0.98-4.34)  | 0,06         |                   |       |
| Cateter Venoso Central        | 18 (48.6)       | 54 (42.5)       | 1.25 (0.60-2.60)  | 0,69         |                   |       |
| Sonda Vesical de Demora       | 24 (64.9)       | 63 (51.6)       | 1.76 (0.82-3.77)  | 0,14         |                   |       |
| Drenos                        | 3 (8.1)         | 18 (14.5)       | 0.53 (0.14-1.89)  | 0,41         |                   |       |
| Úlcera de pressão             | 2 (5.4)         | 4 (1.9)         | 1.73 (0.30-9.83)  | 0,62         |                   |       |
| Esteróides                    | 1 (2.7)         | 7 (5.6)         | 0.47 (0.06-3.93)  | 0,68         |                   |       |
| <i>Uso de antimicrobianos</i> |                 |                 |                   |              |                   |       |
| Oxacilina                     | 4 (10.8)        | 15 (12.0)       | 0.89 (0.28-2.86)  | 1,00         |                   |       |
| Amoxicilina-Clavulanato       | 6 (16.2)        | 15 (12.1)       | 1.42 (0.51-3.97)  | 0,58         |                   |       |
| Piperacilina-Tazobactam       | 3 (8.1)         | 11 (8.9)        | 0.91 (0.24-3.47)  | 1,00         |                   |       |
| Cefazolina                    | 2 (5.4)         | 6 (2.8)         | 1.13 (0.22-5.87)  | 1,00         |                   |       |
| Ceftazidima                   | 2 (5.4)         | 3 (1.4)         | 2.32 (0.37-14.46) | 0,32         |                   |       |
| Cefepima                      | 11 (29.7)       | 36 (28.8)       | 1.05 (0.47-2.33)  | 0,91         |                   |       |
| Imipenem                      | 3 (8.1)         | 17 (13.6)       | 0.56 (0.16-2.03)  | 0,57         |                   |       |
| Ciprofloxacina                | 5 (13.5)        | 17 (13.6)       | 0.99 (0.34-2.90)  | 0,99         |                   |       |
| Levofloxacina                 | 5 (13.5)        | 12 (9.6)        | 1.47 (0.48-4.49)  | 0,54         |                   |       |
| Vancomicina                   | 10 (27.0)       | 31 (24.8)       | 1.12 (0.49-2.58)  | 0,78         |                   |       |
| Clindamicina                  | 1 (2.7)         | 8 (6.4)         | 0.41 (0.05-3.36)  | 0,69         |                   |       |
| Fluconazol                    | 2 (5.4)         | 13 (10.4)       | 0.49 (0.11-2.29)  | 0,52         |                   |       |

Nota: Dados estão em número(percentagem) exceto quando especificado. Nível significância  $p \leq 0.05$ . Análise Multivariada  $p < 0.2$ .

\* Estatisticamente significativa. \*\* Índice de Comorbidades de Charlson, mediana (variação). \*\*\* Transferência de outro serviço.

\*\*\*\* Tempo de internação, mediana (variação). \*\*\*\*\*Internação em UTI (atual ou prévia).

Analisando os fatores de risco para aquisição de MRSA em 96 pacientes queimados através de um estudo caso-controle onde “casos” eram pacientes com cultura

positiva para MRSA e “controles” eram pacientes sem cultura positiva para *S. aureus*, observou-se através de uma análise univariada que fatores como a superfície da queimadura, queimadura de 3º grau, cirurgia, utilização de dispositivos como ventilação mecânica, sonda vesical de demora e catéter venoso central, número de debridamentos, tempo de internação, internação prévia ou atual em UTI e histórico de internação superior a 24h em outro serviço apresentaram nível de significância ( $p \leq 0.05$ ), da mesma forma que uso prévio de oxacilina e cefepima. Na análise multivariada observou-se que pacientes com histórico de internação maior que 24h em outro serviço apresentaram 7.8 vezes mais chances de adquirir MRSA, pacientes com mediana de 15.5 dias de tempo de internação tem 0.95 menos chances de adquirir MRSA comparado com a mediana de 22 dias. Também observou-se nessa análise multivariada que o número de debridamentos aumenta o risco em 6.8 vezes, bem como pacientes com internação prévia ou atual em UTI tem 3.57 vezes mais chances de adquirir MRSA que pacientes sem internação em UTI. Em relação ao uso prévio de antimicrobianos observou-se que pacientes que fizeram uso prévio de vancomicina tem 0.14 vezes apresentaram menos chances de adquirir MRSA em relação aos pacientes que não utilizaram esse antimicrobiano (Tabela 18).

Para analisar os fatores de risco para aquisição de MSSA em 38 pacientes queimados através de um estudo caso-controle onde “casos” eram pacientes com cultura positiva para MSSA e “controles” eram pacientes sem cultura positiva para *S. aureus*, foi possível observar através de uma análise univariada que pacientes com mediana de superfície de queimadura de 22%, pacientes com mediana de 12 dias de internação, ou que se submeteram a cirurgia, ou com média de 1 debridamento, e que utilizaram dispositivos como ventilação mecânica, sonda vesical de demora e cateter venoso central ou que fizeram uso prévio de polimixina B apresentaram significância ( $p \leq 0.05$ ), enquanto que na análise multivariada observou-se que pacientes com histórico de internação superior a 24h em outro serviço apresentaram 8.14 vezes mais chances de adquirir MSSA em relação aos pacientes sem internação prévia em outro serviço. Da mesma forma, pacientes com histórico de internação prévia ou atual em UTI tem 4.27 vezes mais chances de adquirir MSSA do que pacientes sem histórico de internação em UTI (Tabela 19).

---

**Tabela 18:** Análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA isolados de pacientes queimados.

| Fatores de Risco                             | Análise Univariada |                  |                   |         | Análise Multivariada |        |
|--|--------------------|------------------|-------------------|---------|----------------------|--------|
|  | Caso MRSA (n=96)   | Controle (n=134) | OR (IC95%)        | P       | OR (IC95%)           | P      |
| <b>Dados demográficos</b>                    |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Sexo masculino                               | 63 (65,6)          | 79(59,0)         | 1,33 (0,77-2,29)  | 0,31    |                      |        |
| Idade, média                                 | 28,5               | 27,0             | ...               | 0,53    |                      |        |
| <b>Comorbidades</b>                          |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Aids   | 2 (2,1)            | 0                | ...               | 0,17    |                      |        |
| Charlson, mediana (variação)                 | 0 (0-6)            | 0 (0-4)          | ...               | 0,14    |                      |        |
| <b>Tipo de queimadura</b>                    |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Chama  | 65 (65,6)          | 81 (60,4)        | Referência        | ...     |                      |        |
| Escalpo                                      | 19 (19,8)          | 36 (26,8)        | 0,66 (0,35-1,25)  | 0,20    |                      |        |
| Outros                                       | 12 (12,5)          | 17 (12,7)        | 0,88 (0,39-1,97)  | 0,76    |                      |        |
| Superfície da queimadura, mediana (variação) | 17,5 (3-70)        | 13,5 (0,5-80)    | ...               | <0,001* |                      |        |
| Tempo de queimadura                          | 16 (1-192)         | 23,5 (3-183)     | ...               | 0,21    |                      |        |
| Queimadura de 3º grau                        | 41 (42,7)          | 36 (26,9)        | 2,03 (1,16-3,54)  | 0,01*   |                      |        |
| Lesão inalatória                             | 21 (22,6)          | 15 (11,7)        | 2,19 (1,06-4,53)  | 0,031   |                      |        |
| <b>Dados da internação</b>                   |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Mais que 24h em outro serviço                | 44 (45,8)          | 22 (16,4)        | 4,31 (2,34-7,92)  | <0,001* | 7,80 (3,36-18,05)    | <0,001 |
| Tempo sob risco***, mediana (variação)       | 15,5 (1-191)       | 22 (3-183)       | ...               | 0,048*  | 0,95 (0,93-0,98)     | <0,001 |
| Internação em UTI****                        | 39 (40,6)          | 24 (17,9)        | 3,13 (1,72-5,78)  | <0,001* | 3,57 (1,47-8,69)     | 0,005  |
| <b>Imunidade</b>                             |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Uso de esteroides                            | 2 (2,1)            | 7 (5,2)          | 0,38 (0,078-1,90) | 0,31    |                      |        |
| <b>Procedimentos e dispositivos</b>          |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Cirurgia                                     | 67 (69,8)          | 71 (53%)         | 2,05 (1,18-3,56)  | 0,01*   |                      |        |
| Nº de debridamentos                          | 1 (0-8)            | 0,5 (0-4)        | ...               | <0,001* | 6,80 (3,54-13,07)    | <0,001 |
| Enxerto                                      | 40 (41,7)          | 41 (30,6)        | 1,62 (0,94-2,80)  | 0,08    |                      |        |
| Amputação                                    | 1 (1,0)            | 2 (1,5%)         | 0,69 (0,62-7,77)  | 1,00    |                      |        |
| Ventilação mecânica                          | 35 (36,5)          | 22 (16,4)        | 2,92 (1,57-5,41)  | <0,001* |                      |        |
| Sonda vesical de demora                      | 46 (47,9)          | 28 (20,9)        | 3,48 (1,95-6,20)  | <0,001* |                      |        |
| Cateter venoso central                       | 38 (39,6)          | 23 (17,2)        | 3,16 (1,72-5,80)  | <0,001* |                      |        |
| Dreno  | 8 (8,3)            | 8 (6,0)          | 1,43 (0,51-3,95)  | 0,48    |                      |        |
| <b>Uso de antimicrobianos</b>                |                    |                  |                   |         |                      |        |
| Oxacilina                                    | 49 (51,0)          | 47 (35,1)        | 1,93 (1,13-3,29)  | 0,015*  |                      |        |
| Amoxicilina-clavulanato                      | 6 (6,3)            | 10 (7,5)         | 0,82 (0,29-2,35)  | 0,72    |                      |        |
| Ceftazidima                                  | 2 (2,1)            | 0                | ...               | 0,17    |                      |        |
| Cefepima                                     | 39 (40,6)          | 37 (27,6)        | 1,79 (1,02-3,12)  | 0,039*  |                      |        |
| Imipenem                                     | 15 (15,6)          | 14 (10,4)        | 1,58 (0,72-3,46)  | 0,243   |                      |        |
| Gentamicina                                  | 3 (3,1)            | 2 (1,5)          | 2,12 (0,34-12,99) | 0,65    |                      |        |
| Amicacina                                    | 10 (10,41)         | 6 (4,5)          | 2,48 (0,87-7,08)  | 0,08    |                      |        |
| Ciprofloxacina                               | 15 (15,6)          | 17 (12,7)        | 1,28 (0,60-2,70)  | 0,53    |                      |        |
| Clindamicina                                 | 1 (1,0)            | 1 (0,7)          | 1,40 (0,09-22,66) | 1,00    |                      |        |
| Vancomicina                                  | 14 (14,6)          | 19 (14,2)        | 1,03 (0,49-2,18)  | 0,93    | 0,14 (0,03-0,59)     | 0,008  |
| Fluconazol                                   | 6 (6,3)            | 2 (1,5)          | 4,40 (0,87-22,25) | 0,07    |                      |        |
| Anfotericina                                 | 0                  | 2 (1,5)          | ...               | 0,51    |                      |        |

Nota: Dados estão em número(percentagem) exceto quando especificado. Nível significância  $p \leq 0,05$ . Análise Multivariada  $p < 0,2$ .

\* Estatisticamente significante.

**Tabela 19:** Análise dos fatores de risco para aquisição de MSSA isolados de pacientes queimados

| Fatores de Risco                                    | Análise Univariada |                      |                          |                   | Análise Multivariada     |                  |
|---|--------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|------------------|
|   | Caso MSSA (n=38)   | Controle (n=134)     | OR (IC95%)               | P                 | OR (IC95%)               | P                |
| <i>Dados demográficos</i>                           |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| Sexo masculino                                      | 24 (63,2)          | 79 (59,0)            | 1,19 (0,56-2,51)         | 0,64              |                          |                  |
| Idade, média  | 23,7               | 27,0                 | ...                      | 0,34              |                          |                  |
| <i>Comorbidades</i>                                 |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| Doença do Sistema Nervoso Central                   | 0                  | 7 (5,2)              | ...                      | 0,35              |                          |                  |
| Charlson, mediana (variação)                        | 0 (0-1)            | 0 (0-4)              | ...                      | 0,90              |                          |                  |
| <i>Tipo de queimadura</i>                           |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| Chama   | 27 (71,1)          | 81 (60,4)            | Referência               | ...               |                          |                  |
| Escalpo   | 8 (22,9)           | 36 (30,8)            | 0,67 (0,28-1,61)         | 0,37              |                          |                  |
| Outros  | 3 (10,0)           | 17 (17,3)            | 0,53 (0,14-1,24)         | 0,25              |                          |                  |
| <b>Superfície da queimadura, mediana (variação)</b> | <b>22 (2-80)</b>   | <b>13,5 (0,5-80)</b> | <b>...</b>               | <b>&lt;0,001*</b> |                          |                  |
| Tempo de queimadura                                 | 16 (1-230)         | 23,5 (3-183)         | ...                      | 0,28              |                          |                  |
| Queimadura de 3º grau                               | 15 (39,5)          | 36 (26,9)            | 1,77 (0,83-3,77)         | 0,13              |                          |                  |
| Lesão inalatória                                    | 7 (18,4)           | 15 (11,2)            | 1,79 (0,67-4,77)         | 0,27              |                          |                  |
| <i>Dados da internação</i>                          |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| <b>Mais que 24h em outro serviço</b>                | <b>21 (55,3)</b>   | <b>22 (16,4)</b>     | <b>6,28 (2,86-13,80)</b> | <b>&lt;0,001*</b> | <b>8,14 (3,45-19,3)</b>  | <b>&lt;0,001</b> |
| Tempo sob risco***, mediana (variação)              | 12 (1-38)          | 3 (3-183)            | ...                      | 0,09*             |                          |                  |
| <b>Internação em UTI***</b>                         | <b>15 (39,5)</b>   | <b>24 (17,9)</b>     | <b>3,13 (1,72-5,78)</b>  | <b>0,005*</b>     | <b>4,27 (1,72-10,60)</b> | <b>0,002</b>     |
| <i>Imunidade</i>                                    |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| Uso de esteroides                                   | 0                  | 7 (5,2)              | ...                      | 0,35              |                          |                  |
| <i>Procedimentos e dispositivos</i>                 |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| <b>Cirurgia</b>                                     | <b>27 (71,1)</b>   | <b>71 (53%)</b>      | <b>2,17 (1,00-4,74)</b>  | <b>0,04*</b>      |                          |                  |
| <b>Nº de debridamentos</b>                          | <b>1 (0-5)</b>     | <b>0,5 (0-4)</b>     | <b>...</b>               | <b>0,009*</b>     |                          |                  |
| Enxerto   | 15 (39,5)          | 41 (30,6)            | 1,47 (0,70-3,13)         | 0,30              |                          |                  |
| <b>Ventilação mecânica</b>                          | <b>12 (31,6)</b>   | <b>22 (16,4)</b>     | <b>2,35 (1,03-5,34)</b>  | <b>0,03*</b>      |                          |                  |
| Sonda vesical de demora                             | 14 (36,8)          | 28 (20,9)            | 2,20 (1,01-4,10)         | 0,04*             |                          |                  |
| <b>Cateter venoso central</b>                       | <b>13 (34,2)</b>   | <b>23 (17,2)</b>     | <b>2,51 (1,12-5,62)</b>  | <b>0,02*</b>      |                          |                  |
| Dreno   | 1 (2,6)            | 8 (6,0)              | 0,42 (0,05-3,51)         | 0,68              |                          |                  |
| <i>Uso de antimicrobianos</i>                       |                    |                      |                          |                   |                          |                  |
| Oxacilina   | 16 (42,1)          | 47 (35,1)            | 1,34 (0,64-2,80)         | 0,42              |                          |                  |
| Amoxicilina-clavulanato                             | 0                  | 10 (7,5)             | ...                      | 0,12              |                          |                  |
| Cefepima  | 13 (34,2)          | 37 (27,6)            | 1,36 (0,63-2,94)         | 0,42              |                          |                  |
| Imipenem  | 5 (13,2)           | 14 (10,4)            | 1,29 (0,43-3,83)         | 0,76              |                          |                  |
| Meropenem   | 2 (5,3)            | 2 (1,5)              | 3,66 (0,49-26,93)        | 0,17              |                          |                  |
| Gentamicina   | 2 (5,3)            | 2 (1,5)              | 3,66 (0,49-26,93)        | 0,17              |                          |                  |
| Ciprofloxacina                                      | 7 (18,4)           | 17 (12,7)            | 1,55 (0,59-4,01)         | 0,36              |                          |                  |
| Clindamicina  | 1 (2,6)            | 1 (0,7)              | 3,59 (0,22-58,85)        | 0,39              |                          |                  |
| Vancomicina   | 6 (15,8)           | 19 (14,2)            | 1,13 (0,41-3,07)         | 0,80              |                          |                  |
| <b>Polimixina B</b>                                 | <b>3 (7,9)</b>     | <b>1 (0,7)</b>       | <b>11,4 (1,15-112,9)</b> | <b>0,03*</b>      |                          |                  |
| Fluconazol  | 1 (2,6)            | 2 (1,5)              | 1,78 (0,15-20,22)        | 0,53              |                          |                  |

Nota: Dados estão em número(porcentagem) exceto quando especificado. Nível significância  $p \leq 0,05$ . Análise Multivariada  $p < 0,2$ .

\* Estatisticamente significante.



*Discussão*

*Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de infecções hospitalares e na comunidade, e tem sido associado com taxas de mortalidade variando de 15% para 60%<sup>(59)</sup>. Estudos sobre a epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina – MRSA têm demonstrado que apenas alguns clones são responsáveis pela epidemia desses organismos. Propagação clonal de cepas MRSA multirresistentes tem sido relatada entre hospitais geograficamente separados, e mesmo entre países diferentes, sendo que vários desses clones MRSA pandêmicos já foram identificados. No entanto, apesar do grande conhecimento sobre a disseminação clonal de MRSA, sabe-se pouco sobre a epidemiologia molecular das cepas de *Staphylococcus aureus* Sensíveis a Meticilina – MSSA<sup>(26)</sup>.

No presente trabalho foram analisadas 1078 culturas positivas para *S. aureus* sendo 6,2% de hemoculturas, 76,8% de culturas de vigilância, 12,3% swabs de queimaduras, 2,6% de secreções e 2,1% de outros materiais clínicos. Essas amostras foram testadas fenotipicamente segundo recomendação do CLSI<sup>(45)</sup> pela técnica de disco difusão com os discos de oxacilina (1µg) e de cefoxitina (30µg) para caracterização de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina – MRSA, sendo observado que dessas 1078 amostras, 797 amostras (73,9%) apresentaram resistência frente ao disco de Oxacilina (1µg), enquanto que 810 amostras (75,1%) foram resistentes frente ao disco de Cefoxitina (30µg). Esses resultados podem ser corroborados por Velasco et al<sup>(60)</sup> que avaliaram técnicas fenotípicas de detecção de MRSA utilizando isolados clínicos, e relataram que a utilização da técnica de disco difusão com disco de cefoxitina apresentou melhor resultado na detecção de MRSA quando comparado com o disco de oxacilina, mostrando 100% de sensibilidade e 98% de especificidade. Resultados similares foram encontrados por Cauwelier et al<sup>(61)</sup> em que a técnica de disco difusão com disco de cefoxitina (30µg) para detecção de MRSA apresentou melhores resultados em relação ao disco de oxacilina (1µg).

Segundo Chambers<sup>(62)</sup>, a resistência a meticilina tem como característica distinta seu caráter heterogêneo, com variações dos seus níveis de resistência dependendo da forma de cultivo ou do antibiótico betalactâmico escolhido. A maioria das células em cepas heterogêneas é mais sensível a baixas concentrações de antibióticos betalactâmicos com poucas células capazes de crescer em concentrações superiores do antibiótico. A grande maioria dos isolados clínicos exibe esse padrão heterogêneo de

---

resistência sob condições de crescimento de rotina. A expressão fenotípica codificada pelo gene *mecA* é afetada por vários fatores, incluindo pH, temperatura e osmolaridade<sup>(63)</sup>. Esses fatos podem justificar os achados do presente trabalho onde na detecção genotípica de MRSA pela presença do gene *mecA* foram detectados 47 amostras que carregavam o gene *mecA* mas fenótipo de sensibilidade frente ao disco de oxacilina, enquanto 39 amostras apresentaram fenótipo de sensibilidade aos discos de cefoxitina e oxacilina concomitantemente, mostrando sensibilidade de 88,4% e 86% com discos de cefoxitina e oxacilina, respectivamente e 100% de especificidade.

As amostras também foram avaliadas fenotipicamente quanto a perfil de resistência frente aos discos vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg) e gentamicina (10 µg), com todas as 1078 amostras testadas sensíveis a vancomicina. Para os demais antibióticos testados 165 amostras (15,3%) apresentaram resistência somente a eritromicina (15 µg) e 526 amostras (48,8%) a eritromicina e gentamicina (10 µg) simultaneamente. Dados similares foram obtidos em estudo realizado por Petrelli et al<sup>(64)</sup> analisando um grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de ponta de cateter em pacientes que apresentavam sinais clínicos de bacteremia e hemoculturas positivas, com 50% dos isolados resistentes a Eritromicina e 37,8% resistentes a Gentamicina.

Van Dijk et al<sup>(65)</sup> em estudo sobre a genotipagem de 226 isolados clínicos MSSA não observaram altas taxas de resistência frente à gentamicina, mas perceberam percentuais de resistência de 72, 11 e 7% para penicilina, eritromicina e clindamicina, respectivamente. Esses dados corroboram os resultados encontrados nesse trabalho onde dos 107 isolados MSSA (*mecA* negativo) 13,1% apresentaram percentuais de resistência somente para eritromicina e 2,8% para a eritromicina e gentamicina simultaneamente.

Em adição, das 66 amostras provenientes de hemoculturas testadas fenotipicamente quanto ao seu perfil de resistência, 8 amostras (12,2%) foram resistentes somente a eritromicina e 25 amostras (37,9%) foram resistentes a eritromicina e gentamicina concomitantemente e das 828 amostras provenientes de swabs nasais, 20,4% (169 amostras) foram resistentes somente a eritromicina e 48,4% (401 amostras) foram resistentes a eritromicina e gentamicina simultaneamente. Peck et al<sup>(66)</sup> em estudo caracterizando *S. aureus* isolados de hemoculturas e swabs nasais em um hospital coreano relataram que nos isolados de hemocultura mais de 80%

---

apresentaram resistência a eritromicina e gentamicina e que em isolados de swab nasal os percentuais de resistência foram de 46.3% e 18.9%, para eritromicina e gentamicina, respectivamente.

Das 336 amostras MRSA (*mecA* positivas) submetidas a subtipagem do cassette cromossômico estafilocócico SCC*mec* pela técnica de Multiplex-PCR, 305 (90,8%) apresentaram SCC*mec* tipo III ou IIIA, esses dados podem ser corroborados pelos achados de Perez e D'Azevedo<sup>(67)</sup> que em estudos dos tipos clonais e do perfil de resistência a antimicrobianos de MRSA isolados de hemoculturas de hospitais do Sul do Brasil concluíram que o gene *mecA* dos isolados dessa população é carregado pelo SCC*mec* Tipo III.

O perfil clonal de amostras isoladas de pacientes queimados pela técnica de PFGE com a enzima *SmaI* utilizando como *cutoff* a similaridade de 80% revelou 2 clones majoritários com similaridade maior que 80%. Em adição, 15 isolados que foram agrupados nos 2 clones majoritários, todos apresentaram SCC*mec* Tipo III ou IIIA e apenas um isolado foi positivo para o gene *pvl*. Esses dados estão de acordo com os resultados observados por Bartels et al<sup>(68)</sup> em estudo com 32 MRSA isolados de hospitais da República da Geórgia em que todos isolados apresentaram SCC*mec* Tipo IIIA e foram PVL negativo.

A presença de 2 clones majoritários pode indicar a presença de clones MRSA endêmicos na unidade de queimados do hospital, já que esses isolados foram coletados no período de 2006 a 2008. Dados similares foram descritos por Oliveira et al<sup>(22)</sup> em um estudo com 83 MRSA isolados de hospitais brasileiros para caracterização do Clone Endêmico Brasileiro, com 78.3% dos isolados pertencente a um mesmo tipo clonal o que poderia indicar a disseminação de um clone MRSA endêmico entre os hospitais onde as amostras foram coletadas.

Analisando o perfil clonal das amostras invasivas no presente estudo foi possível observar a presença de 4 clones majoritários que agruparam 30 isolados com perfil toxigênico importante. Dados similares foram encontrados por Souza-Junior et al<sup>(69)</sup> em um estudo de genotipagem de 45 amostras MRSA invasivas isoladas no nordeste brasileiro sendo observado através da análise do perfil clonal, 8 perfis PFGE que agruparam em sua maioria isolados que carregavam SCC*mec* Tipo IIIA e alguns agruparam em um mesmo cluster amostras SCC*mec* Tipo IV. Esses dados são similares

---

aos achados em nosso estudo onde um dos grupos majoritários agrupou alguns isolados do tipo IV (Grupo D com similaridade de 81.7%).

O estudo do perfil clonal das amostras MRSA colonizantes demonstrou a presença de 8 clones majoritários que juntos agruparam 96 amostras, sendo que um desses grupos agrupou a maioria dos isolados SCC*mec* Tipo IV (Grupo D com similaridade 82.5%), isolados SCC*mec* Tipo III e IIIA, o que pode ser corroborado pelos achados de Lamaro et al<sup>(70)</sup> que em um estudo realizado com crianças que frequentam creches no Estado de Goiás no Brasil encontraram vários clones de MRSA, incluindo isolados com SCC*mec* III, IV e V. Ellis et al<sup>(71)</sup> analisando a presença e a epidemiologia molecular de MRSA colonizantes e invasivas isoladas de soldados relataram que o perfil clonal majoritário das amostras MRSA colonizantes isoladas eram SCC*mec* Tipo IV o que diverge em parte dos resultados observados no nosso estudo onde a maioria dos isolados de amostras colonizantes apresentaram SCC*mec* Tipo III e IIIA.

Estudos anteriores tem mostrado colonização como principal fator de risco para infecção. Em um estudo recente, mais de 7% das internações hospitalares em um hospital urbano foi estimada em portadores nasais de MRSA, com as narinas servindo como ponto de colonização e reservatório de infecção<sup>(72)</sup>. Em outro estudo, > 82% dos pacientes que desenvolveram bacteremia mostraram um perfil clonal majoritário colonizante<sup>(73)</sup>. Além disso, os clones presentes foram encontrados relacionados com bacteremias nos mesmos pacientes até 14 meses depois. Em outro estudo realizado por Robicsek et al<sup>(74)</sup>, foi observado que mais em 67% dos pacientes com infecção por MRSA eram colonizados por MRSA.

Uma característica apontada em estudos epidemiológicos de caracterização dos CA- MRSA é a presença, muito constante, de dois marcadores moleculares potenciais para muitas dessas amostras: os genes que codificam para a leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) e a presença da SCC*mec* tipo IV<sup>(75-77)</sup>. Nesse estudo foi possível detectar 25 amostras MRSA SCC*mec* Tipo IV, a partir de 2007. Dessas amostras 5 (20%) apresentaram o gene da Leucocidina de Pantone Valentine, dados similares foram encontrados em um estudo sobre a presença policlonal de isolados nmMRSA (non-resistant MRSA) que carregavam SCC*mec* Tipo IV relatando que somente 15% das amostras do seu estudo carregavam gene para Leucocidina de Pantone Valentine<sup>(78)</sup>.

---

Resultados similares também têm sido observados entre as amostras da Austrália onde a maioria dos CA-MRSA clássicos estudados foram desprovidos dos genes que codificam para PVL<sup>(79,80)</sup>. Killic et al<sup>(81)</sup> em estudo para determinar o tipo SCCmec e ocorrência do gene PVL em amostras MRSA isoladas de adultos e crianças em um hospital universitário observaram que os isolados SCCmec Tipo IV infectaram mais frequentemente crianças e apresentaram o gene PVL com maior frequência, sendo esses dados divergentes dos encontrados em nosso estudo onde apenas 20% das amostras SCCmec Tipo IV carregavam o gene da PVL e dessas amostras apenas 2 foram invasivas (secreções).

Ellington et al<sup>(82)</sup> analisando 224 isolados de *S. aureus* para determinar a prevalência de genes que codificam PVL entre isolados de pacientes com bacteremia, relataram como resultado baixa incidência de amostras MSSA PVL+ (1.6%) e que das amostras MRSA todas foram PVL- (36%). Esses dados divergem parcialmente dos resultados observados no presente trabalho pois das 69 amostras positivas para *pvl*, 11.6% eram MSSA e 88.4% MRSA. Na análise univariada foi possível notar que a presença desse gene é mais significativa em amostras MRSA em relação à MSSA (OD 2,74 (1,26 -5,94) – *p* 0,0087). Das 61 amostras MRSA PVL+, 87% carregavam o SCCmec Tipo III ou IIIA. Resultados similares foram descritos por Wannet et al<sup>(83)</sup> que analisando 20 amostras MRSA PVL positivas isoladas de hospitais holandeses observaram que parte desses isolados apresentaram SCCmec tipo III.

Dauwalder et al<sup>(84)</sup>, avaliando a epidemiologia de clones invasivos de MRSA na França relataram que a presença de um perfil clonal circulante com SCCmec Tipo IV e carreador do gene *pvl* e também do gene *tst*. No presente estudo observamos através de uma análise dos fatores relacionados à invasividade de amostras MRSA que amostras com SCCmec tipo III e IV foram 2.19 e 5.28 vezes mais invasivas, respectivamente. Também foi possível observar que da mesma forma que os achados encontrados por Dauwalder et al<sup>(84)</sup>, as amostras com a presença do genes da Leucocidina de Pantone Valentine são 2.38 vezes mais invasivas que as colonizantes. Os resultados desse estudo também revelaram a presença do gene da toxina esfoliativa B (*etb*) com fator importante para invasão. Problemas com o tratamento de CA-MRSA positivos para *etb* causando a Síndrome da Pele Escaldada em adultos saudáveis tem sido relatados no Japão<sup>(85)</sup>.

---

Em nosso estudo das 20 amostras SCCmec Tipo IV PVL negativo, 35% e 25% foram positivas para os genes *sea* e *sec-I*, respectivamente e todas foram positivas para os genes da produção de biofilme (*icaA* e/ou *icaD*). Zhang et al<sup>(86)</sup> em um estudo que avaliou a coexistência de cepas MRSA PVL+ e PVL- no Canadá, observaram que de 120 isolados MRSA SCCmec Tipo IVa PVL negativo, 76.6% (92 isolados) foram positivos para os genes das enterotoxina estafilocócica A (*sea*), da enterotoxina estafilocócica C (*sec-I*) e para o operon *ica* para produção de biofilme.

A análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA SCCmec tipo IV revelou o uso de cateter com fator de proteção (OR=0,22). Esse resultado não é surpreendente, uma vez que já é bem estabelecido que a aquisição desse tipo de cassete associado principalmente a CA-MRSA não está associado a fatores de risco normalmente relacionados à aquisição de outros tipos de MRSA, que inclui na maioria das vezes uso de cateteres, cirurgia, internação em UTI e uso prévio de antimicrobianos<sup>(87)</sup>. Dado intrigante e que merece maior investigação foi o uso de metronidazol como fator de risco de 7,2 para aquisição de SCCmec tipo IV.

Das 25 amostras SCCmec Tipo IV do presente trabalho, 32% apresentaram resistência à eritromicina e gentamicina concomitantemente. Esses dados são similares aos dados encontrados por Schuenck et al<sup>(78)</sup> que relatam que cepas nmMRSA (non-multiresistant MRSA) tem aos poucos emergido como um importante agente nas infecções estafilocócicas e que esses nmMRSA SCCmec Tipo IV apresentaram em seu estudo taxas de resistência de 60% e 10% a eritromicina e gentamicina, respectivamente. Alguns estudos mais recentes relatam que cepas de CA-MRSA (SCCmec Tipo IV) podem expressar resistência a alguns outros antibióticos além dos β-lactâmicos, como a eritromicina, clindamicina<sup>(88,89)</sup>, tetraciclina<sup>(90)</sup>, levofloxacina<sup>(89)</sup> e inclusive ao cloranfenicol e gentamicina<sup>(88)</sup>.

Miranda et al<sup>(91)</sup> em estudo no Brasil, observaram que amostras analisadas e caracterizadas como SCCmec tipo IIIA apresentaram fenótipos de resistência a diversos antibióticos incluindo a gentamicina e eritromicina, confirmando o perfil multiresistente característico desse tipo de cassete cromossômico, o que corrobora os resultados observados no presente estudo, onde os perfis fenotípicos de resistência dos 305 isolados MRSA SCCmec tipo III e IIIA mostraram 55,4% de resistência concomitante para eritromicina e gentamicina, 73,1% somente para eritromicina.

---

Becker et al<sup>(92)</sup> estudando a prevalência de genes que codificam toxinas estafilocócicas em amostras de sangue e swab nasal, relataram que o gene da Síndrome do Choque Tóxico foi o mais prevalente entre as amostras analisadas (20.3%), seguidos pelos genes da Enterotoxina A (15.9%), da Enterotoxina C (11.2%) e da Enterotoxina B (6.8%). Esses dados divergem dos dados encontrados nesse estudo onde, das 443 amostras de *S. aureus* testadas, os genes mais frequente foram respectivamente, o da Enterotoxina C (38,1%), seguido do gene da Enterotoxina A (31,8%), gene da Enterotoxina B (19,8%) e gene da Síndrome do Choque Tóxico (14%).

Campbell et al<sup>(93)</sup> em estudo para avaliar as características genotípicas de *S. aureus* isolados de uma triagem multinacional de infecções de pele, observaram que para cepas MSSA os genes da enterotoxina estafilocócica A – *sea* ( $p < 0.01$ ) e o gene da Leucocidina de Pantón Valentine – *pvl* ( $p = 0.01$ ) foram mais encontrados, enquanto para as cepas MRSA os mais freqüentes foram os genes da Síndrome do Choque Tóxico – *tst* ( $p = 0.02$ ), enterotoxina estafilocócica A – *sea* ( $p = 0.04$ ) e os genes das toxinas esfoliativas A – *eta* e B – *etb* (ambos  $p < 0.01$ ). Esses dados conferem parcialmente com os achados em nosso estudo, onde através de uma análise univariada, foi possível observar que a presença dos genes das enterotoxinas ( $p \leq 0.01$ ) em amostras MRSA foi mais freqüente em relação às amostras MSSA, bem como o gene *pvl* ( $p \leq 0.01$ ). Resultados divergentes foram encontrados por Schmitz et al<sup>(94)</sup> em que na avaliação da produção de enterotoxinas estafilocócicas em amostras MRSA e MSSA relataram não haver diferença significativa do perfil enterotoxigênico.

Na análise multivariada para a análise dos fatores de risco dos 35 pacientes com amostras MRSA *pvl+* isoladas no presente estudo foi possível observar que pacientes que fizeram uso prévio de clindamicina apresentaram 4.29 vezes mais chances de adquirir MRSA *pvl+* do que pacientes que não fizeram uso prévio desse antimicrobiano, esse dado não é descrito na literatura e precisa ser melhor investigado.

Os resultados desse estudo mostraram que dos 35 MRSA isolados de hemoculturas, 14,3% foram positivos para os genes *tst* e nenhum para gene *pvl* e 94,3% carregavam SCC*mec* Tipo III ou IIIA. Esses dados divergem dos apresentados por Budimir et al<sup>(95)</sup> que em um estudo para caracterização molecular de 82 MRSA isolados de hemoculturas relataram que 89% dos isolados carregavam SCC*mec* Tipo I e 11%

---

---

carreavam SCCmec Tipo III modificado e que nenhum dos isolados analisados foi positivo para os genes *tst* e *pvl*.

O perfil de virulência das 107 amostras MSSA revelou maior frequência dos genes *hla* (100%), *hld* (100%), *icaA* (98,1%), *icaD* (98,1%), *sec-1* (20,5%), *sea* (19,6%), *seb* (12,1%), *tst* (6,5%), *etb* (1,9%) e *eta* (0,9%). Lomholt et al<sup>(96)</sup> analisando a dinâmica clonal e os fatores de virulência de 28 clones de *S. aureus* sensíveis a meticilina e eritromicina isolados de crianças com dermatite atópica verificaram maior frequência dos genes *sea* (29%), *seb*, *sec-1*, *eta* e *etb* (ambos 4%) e não encontraram nenhum isolado positivo para *tst*. A análise da presença do gene da Síndrome do Choque Tóxico – *tst* nas amostras de *S. aureus* desse estudo revela que das 62 amostras positivas para o gene *tst*, 88,7% estavam presentes em isolados MRSA, enquanto 11,3% em isolados MSSA. Esses dados divergem dos apresentados por Durand et al<sup>(97)</sup> que em estudo realizado na França para caracterização de 103 isolados de *S. aureus* produtores de TSST-1, encontraram 26,2% presentes em isolados MRSA e 73,8% em isolados MSSA.

Em nosso estudo, a análise do perfil genotípico dos isolados através da detecção dos genes da produção de biofilme (*icaA* e *icaD*) mostrou que 95,3% das amostras MSSA apresentaram simultaneamente os genes *icaA* e *icaD* e três apresentaram apenas o gene *icaA* e duas apenas o gene *icaD*. Todas as amostras MRSA apresentaram pelo menos um gene da produção de biofilme sendo que as 9 amostras *icaA* negativas (2,7%) foram *icaD* positivas, da mesma forma que 10 amostras *icaD* negativas foram *icaA* positivas (3%) e 94,3% apresentaram simultaneamente os genes *icaA* e *icaD*. Resultados similares foram relatados por Grinholt et al<sup>(98)</sup> que em estudo para avaliação da produção e prevalência do gene *icaD* em isolados MRSA e MSSA relataram que 91% dos MRSA carregam o gene *icaD* e os isolados *icaD* negativos foram *icaA* positivos.

Satorrez e Alcaráz<sup>(99)</sup> estudando a prevalência dos genes *icaA* e *icaD* em *S. aureus* e *S. epidermidis* isolados de pacientes e de profissionais da saúde observaram que em 35,2% das amostras de *S. aureus* isolados de hemoculturas e culturas de cateter de pacientes foram positivas para os genes *icaA* e *icaD* simultaneamente, enquanto que 22,2% isolados de swab nasal dos profissionais de saúde que carregam *S. aureus* apresentaram algum gene da formação de biofilme. Nosso resultados mostraram que

---

240 isolados de cultura de vigilância (54,2%) carregam simultaneamente os genes *icaA* e *icaD*, enquanto que 46 isolados de hemocultura (95,8%) apresentaram esse perfil, reforçando a importância da determinação de isolados com potencial para formação de biofilme em ambientes nosocomiais, tanto em isolados relacionados a infecções quanto em pacientes colonizados. Yazdani et al<sup>(100)</sup> em um outro estudo sobre a detecção dos genes *icaAD* e formação de biofilme em 50 isolados de *S. aureus* de feridas observaram que todas as amostras testadas foram positivas para os genes *icaAD*, entretanto apenas 54% foram produtores de biofilme detectados por técnicas fenotípicas.

Amaral et al<sup>(101)</sup> em um estudo para avaliar a capacidade de formação de biofilme em uma variante do Clone Epidêmico Brasileiro – BEC, relataram uma grande capacidade de produção de biofilme por esse tipo clonal, esses dados podem justificar o resultado encontrado em nosso trabalho onde, realizando uma análise univariada dos fatores de virulência em relação às amostras MRSA SCC*mec* Tipo III ou IIIA foi possível observar que a presença do gene *icaA* de formação de biofilme foi significativo em relação aos outros tipos de SCC*mec* encontrados (OD 5,33 (1,26 – 22,52) – *p* 0,04).

Devido ao crescente aumento nas taxas de resistência antimicrobiana, especialmente em microrganismos que causam infecção nosocomial é importante entender os fatores de risco para aquisição desses microrganismos, em especial os multirresistentes como o *S. aureus*. Segundo Kluytmans et al<sup>(102)</sup>, o fator de risco para aquisição de MRSA em relação à colonização nasal é principalmente a administração de antibióticos múltiplos que acaba modificando a flora bacteriana nasal. Como exemplo disso pode-se citar a disseminação de *S. aureus* resistentes a Penicilina após a contaminação ambiental com esse antibiótico, da mesma forma, a administração de tetraciclina que induziu a disseminação de cepas resistentes a esse antimicrobiano. Esse mecanismo de aumento da propagação sob a pressão de antibióticos pode contribuir para o aumento de MRSA no ambiente hospitalar. No presente estudo, a análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA isolados de pacientes não queimados através de uma análise multivariada, mostrou que pacientes que realizaram cirurgia tem 3.01 vezes mais chances de adquirir MRSA, da mesma forma que pacientes que apresentaram úlceras de pressão tem 11.44 vezes mais chance de adquirir MRSA. Esses dados divergem dos dados relatados por Graffunder e Venezia<sup>(103)</sup> que observaram que utilizações prévias de antibióticos betalactâmicos e o tempo de internação foram

---

significativos fatores de risco para aquisição de MRSA. Marshall et al<sup>(104)</sup>, em um estudo avaliando os fatores de risco para aquisição de MRSA por pacientes com trauma em UTI, observaram que pacientes com trauma apresentavam particular risco de se tornarem colonizados por MRSA e confirmaram a associação entre o tempo de internação e o uso de antibióticos, observando também valores significativos para laparotomia e mecanismos de trauma. Os resultados de uma análise multivariada realizada em estudo que analisou a resistência a meticilina entre isolados de hemoculturas em um departamento de emergência demonstraram que pacientes submetidos a cirurgia recente (OR, 3.41; 95% CI, 1.48-7.85), hospitalização recente (2.17; 1.06-4.62), e idade igual ou superior a 61 anos (2.39; 1.25-4.57) foram independentemente associados a aquisição de MRSA, esses dados corroboram em parte com os encontrados em nosso estudo onde em uma análise multivariada foi possível observar que pacientes que foram submetidos a cirurgia tem 3.01 vezes mais chance de adquirir MRSA do que pacientes sem MRSA<sup>(105)</sup>.

No presente estudo a avaliação dos fatores de risco para aquisição de MRSA em pacientes não queimados e queimados demonstrou que o uso prévio do antimicrobiano vancomicina atuou como fator de proteção (OR=0.33, OR=0,14, respectivamente) para aquisição de MRSA. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a vancomicina é ainda considerado o padrão ouro para o tratamento das infecções graves causadas por *S. aureus*, com 100% de sensibilidade nas amostras incluídas nesse estudo e, portanto atua como um agente profilático na aquisição do MRSA. Entretanto é importante mencionar que o uso prolongado de vancomicina pode levar à emergência de estafilococos com resistência intermediária a vancomicina<sup>(87)</sup>.

Estudo comparativo sobre a prevalência de *S. aureus* importados de UTIs de um hospital universitário em Pernambuco<sup>(106)</sup>, demonstrou que houve associação significativa entre a procedência hospitalar e aquisição de isolados MSSA, enquanto que no presente estudo observou-se que pacientes com histórico de internação em UTI apresentaram 4.64 vezes mais chances de adquirir MSSA do que pacientes sem cultura positiva para MSSA.

MRSA é o maior desafio para o paciente queimado, com potencial de causar significativa morbidade e mortalidade. Esses pacientes têm apresentado colonização ou infecção com mais frequência que outros pacientes. Queimaduras extensas são

---

particularmente suscetíveis às infecções resultantes da ruptura da barreira normal da pele e depressão do sistema imune do paciente. Tempo prolongado de internação e antibioticoterapia tem sido relatado como importantes fatores de risco para aquisição de MRSA por esse grupo de pacientes<sup>(107)</sup>. Macedo et al<sup>(108)</sup> analisando fatores de risco de sepse em pacientes queimados observou que o uso de três ou mais cateteres, a presença de duas ou mais complicações, a superfície corporal queimada  $\geq 30\%$ , o agente chama aberta e o sexo feminino foram os principais fatores de risco. Os fatores de risco significativos encontrados nesse estudo foram a internação em UTI e mais de 24h em outro serviço, o que sugere que a conduta de controle e prevenção das infecções nos diferentes hospitais podem influenciar na colonização dos pacientes por agentes multiresistentes. Hunt et al<sup>(109)</sup> descreveram uma correlação direta entre o tempo de internação e o risco de um paciente queimado adquirir MRSA. Em nosso estudo observou-se que o tempo sob risco com mediana de 15,5 dias diminuiu a chance de infecção em 0,95 vezes quando comparado com a mediana de 22 dias.

Olivo et al<sup>(110)</sup> em estudo retrospectivo para análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA entre os pacientes da unidade de queimados do Hospital Estadual Bauru, observaram em um estudo de coorte em 175 pacientes que o local de queimadura e a manipulação cirúrgica dos tecidos queimados estão relacionados com a aquisição de MRSA. Esses dados corroboram os resultados encontrados em nosso trabalho, onde analisando os fatores de risco para 96 pacientes do mesmo hospital com culturas positivas para MRSA observou-se que pacientes com média de 1 debridamento tem 6.8 vezes mais chances de adquirir MRSA do que pacientes queimados sem manipulação cirúrgica dos tecidos queimados.

Chaudhary et al<sup>(111)</sup>, em um estudo para determinação de fatores de risco para aquisição nosocomial de MRSA e mortalidade em pacientes queimados hospitalizados em uma unidade de queimados relataram que queimaduras de terceiro grau foram fatores de risco significativos. No presente estudo embora a queimadura de terceiro grau não tenha sido um fator de risco independente para aquisição de MRSA em queimados na análise multivariada, observou-se como um fator de risco significativo na análise univariada ( $p=0,01$ ).

---

O conhecimento da epidemiologia e dos fatores de risco para aquisição de MRSA colonizantes ou invasivos no hospital estudado são dados importantes que podem auxiliar na prevenção e controle desses microrganismos.

---

*Considerações Finais*

Baseado nas análises dos resultados observados no presente trabalho foi possível observar que das amostras avaliadas genotipicamente 75.8% eram MRSA e que carregavam em sua maioria SCC*mec* Tipo III ou IIIA o que demonstra que os clones endêmicos isolados dos pacientes do hospital estudado ainda se assemelham ao Brazilian Endemic Clone – BEC que segundo a literatura, ainda é o clone mais disseminado no Brasil, entretanto foi possível observar amostras MRSA SCC*mec* Tipo II e Tipo IV corroborando os relatos de uma mudança do perfil clonal em amostras MRSA no país.

As amostras MRSA apresentaram um perfil enterotoxigênico mais significativo do que as amostras MSSA, da mesma forma que a presença do gene da Leucocidina de Panton Valentine também foi mais significativamente mais presente em amostras resistentes em relação às sensíveis.

Na análise dos fatores de risco para aquisição de MRSA carregando gene da Leucocidina de Panton Valentine (MRSA pvl+) foi possível notar que o uso prévio de Clindamicina foi um fator de risco independente para aquisição de MRSA pvl+, bem como o uso de metronidazol como fator de risco para aquisição de MRSA SCC*mec* tipo IV, sendo que esses resultados precisam ser mais investigados para melhor entendimento.

Amostras de *S. aureus* apresentaram maior capacidade invasiva quando eram carregadoras de SCC*mec* Tipo III e Tipo IV, da mesma forma quando apresentaram os genes da Toxina Esfoliativa B e da Leucocidina de Panton Valentine, esses dados ressaltam a importância na determinação do perfil de resistência e virulência do *S. aureus*, baseado no fato dessa bactéria ainda ser um dos maiores responsáveis por infecções nosocomiais e agora também comunitárias. A detecção desses genes em cepas de *S. aureus* entre os pacientes colonizados pode ser utilizada com indicativo de pacientes que precisam de maior acompanhamento e medidas intensivas de controle de infecção.

Em amostras invasivas ou colonizantes de MRSA, bem como MRSA isolados de pacientes queimados ou não queimados foi observado a presença de alguns perfis clonais majoritários persistentes, dessa forma os resultados obtidos no presente trabalho podem auxiliar no estabelecimento de medidas de controle e prevenção no hospital estudado.

---

A determinação dos fatores de risco para aquisição de *S. aureus* seja resistente ou sensível a meticilina auxiliará no manejo dos pacientes infectados e/ou colonizados no hospital estudado.

---



## *Referências*

1. MUTO, C.A.; JERNIGAN, J.A.; OSTROWSKY, B.E.; RICHEL, H.M.; JARVIS, W.R.; BOYCE, J.M. and Farr, B.M. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. **Infect. Control Hosp. Epidem.** 2003. 24(5):362-386.
  02. FOSTER, T.J. Immune evasion by staphylococci. **Nat. Rev. Microbiol.** 2005.3: 948- 958.
  03. DINGES, M.M.; ORWIN, P.M. and SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbial. Reviews.** 2000. 13(1):16-34.
  04. LADHANI, S.; JOANNOU, C.L.; LOCHRIE, D.P.; EVANS, R.W. and POSTON, S.M.. Clinical, microbial, and biochemical aspects of exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. **Clin. Microbial. Reviews.** 1999.12(2): 224-242.
  05. ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. **N. Engl. J. Med.** 1998.344:55-56.
  06. BOHACH GA, FAST DJ, NELSON RD, SCHLIEVERT PM. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Critical Reviews in Microbiology*. 1990.17(4): 251-272.
  07. HANSEN, A. and SOLLID, J.U.E. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2006.46:08-20.
  08. LE LOIR, I.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** 2003.2:63-76.
-

09. FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.E.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R. and MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **PNAS**. 2001. 98(15):8821-8826.
  10. FINCH, R. Gram-positive infections: lessons learnt and novel solutions. **Clin. Microbial. Infect.** 2006.12 (81):3-8.
  11. BARRET, J.F. MRSA – what is it, and how do we deal with the problem? **Expert Opin. Ther. Targets**. 2005.9:253-265.
  12. DERENSKI, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. **Clin. Infect. Dis.** 2005.40:562-573.
  13. McCULLOCH, J.A. Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos. São Paulo. 2006. 108(Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
  14. ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. **Drug. Resist. Updat.** 2003.6:41-52.
  15. ENRIGTH, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H. and SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS**. 2002. 99(11):7687-7692.
  16. HIRAMATSU, K.; LONGZHU, C.U.I.; KURODA, M. and ITO, K. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiol.** 2001. 9(10):486-493..
-

17. ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004.48:2637-2651.
  18. INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2009. 4961–4967.
  19. REINERT, C. Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*) de cepas endêmicas nosocomiais de *S. aureus* resistentes a meticilina e vancomicina. São Paulo. 2004. 71p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
  20. ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1999.43:449-1458.
  21. GARDELLA, N.; PICASSO, R.; PREDARI, S.C.; LASALA, M.; FOCCOLI, M.; BENCHETRIT, G.; FAMIGLIETTI, A; CATALANO, M.; MOLLERACH, M. and GUTKIND, G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible rifampicina, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. **Rev. Argentina Microbiol.** 2005.37:156-160.
  22. OLIVEIRA, G.A. , FARIA, J.B. LEVY, C.E. AND MAMIZUKA, E.M. Characterization of the Brazilian Endemic Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Hospitals Throughout Brazil. **Braz J Infect Dis** 2001. 5(4):163-170.
-

23. PANNUTTI, C.S. and GRINBAUM, R.S. An overview of nosocomial infection control in Brazil. **Infect. Control and Hosp. Epidem.** 1995.16.:170-174.
  24. SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C.; HOLLIS, R.J. and LEME, A. Oxacillin- and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. **Infect. Control and Hosp. Epidem.**1993.14:260-264..
  25. FITZGERALD, J.R. and MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria **Trends in Microbiol.** 2001.9(11):547-552.
  26. CHAVES, F.; GARCIA-MARTINEZ, J.; MIGUEL, S.; SANZ, F. and OTERO, J.R. Epidemiology and clonality of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in a tertiary-care hospital in Spain. **Infect. Control Hosp. Epidem.** 2005. 26 (2):150-156.
  27. GOMES, A.R.; WESTH, H. and de LENCASTRE, H. Origins and evolution of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2006.50(10):3237-3244.
  28. ROBERTS, R.B.; de LANCASTRE, A. and EISNER, W. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals: MRSA collaborative group. **J. Infect. Dis.**1998.78:164-171.
  29. ROMAN, R.S.; SMITH, J. and WALKER, M. Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Clin. Infect. Dis.**1997. 25:698-705.
  30. VIVONI, A.; DIEP, B.A.; MAGALHÃES, A.C.G.; SANTOS, K.R.N.; RILEY, L.W.; SENSABAUGH, G.F. and MOREIRA, B.M. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. **J. Clin Microbiol.**2006 44(5):1686-1691.
-

- 
31. SEAS, C.; HERNANDEZ, K.; RAMOS, R.; BAZAN, E.; RODRIGUEZ, I.; TORRES, A.; ZAMUDIO, C. and GOTUZZO, E. Oxacillin-resistant and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Lima, Peru. **Infect. Control and Hosp. Epidem.** 2006. 27(2)
  32. CORSO, A.; SANCHES, I.S. and SOUSA, M.A. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. **Microb. Drug. Resist.** 1998 4:277-288.
  33. TEIXEIRA, L.A.; RESENDE, C.A.; ORMONDE, L.R.; ROSENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A.M.S.; DE LENCASTRE, H. AND TOMASZ, A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J. Clin Microbial.** 1995. 33(9):2400-2404.
  34. DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A. AND TURNIDGE, J. Genetic relatedness of multidrug-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood-stream isolates: sentry antimicrobial resistance surveillance centers worldwide. **Microb. Drug Resist.** 2000.6:213-221.
  35. NAIMI, T.S.; LEDELL, K.H. and BOXRUD, D. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. **Clin. Infect. Dis.** V. 33. p 990-996. 2001.
  36. MERRER, J.; SANTOLI, F.; APPERE DE VECCHI, C.; TRAN, B.; DE JONGHE, B. and OUTIN, H. "Colonization pressure" and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. **Infect. Control and Hosp. Epidem.** 2000.21:718-723.
  37. DAVIS, K.A.; STEWART, J.J.; CROUCH, H.K.; FLOREZ, C.E. and HOSPENTHAL, D.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. **Clin. Infect. Dis.** 2004.39:776- 782.
-

38. HARDY, K.J.; OPPENHEIM, B.A.; GOSSAIM, S.; GAO, F. and HAWKEY, P.M. A study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patient's acquisition of MRSA. **Infect. Control and Hosp. Epidemiol.**2006.27(3):127-132.
  39. HUANG, S.S. and PLATT, R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. **Clin. Infect. Dis.** 2003. 36:281-285.
  40. BERTINI, G.; NICOLETTI, P.L.; SCOPETTI, F.; MANOCHER, P.; DANI, C. and OREFICI, G. *Staphylococcus aureus* epidemic in a neonatal nursery: a strategy of infection control. **Eur. J. Pediatr.** 2006.
  41. TRZEINSKI, K.W.; HRYNIEWIEZ, W.; KLUYSMANS, J.; van LEEUWEN, W.; SIJMONS, M.; DULNY, G.; VERBRUGH, H. and van BELKUN, A. Simultaneous persistence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* in a neonatal ward of a Warsaw hospital. **J. Hosp. Infect.** 1997. 36: 291-303.
  42. FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H. and O'GARA, J.P. Evidence for *icaADBC*Independent biofilm development mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.** 2005.43(4):1973-1976.
  43. FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R.; MUÑIZ, J.; ALVAREZ, M.A. and MARTÍN, M.C. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. **J. Clin Microbiol.**2005.43.(3): 1278-1284.
-

44. FEIL, E.J.; COOPER, J.E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, D.A.; ENRIGTH, M.C.; BERENDT, T.; PEACOCK, S.J.; SMITH, J.M.; MURPHY, M.; SPRAT, B.G.; MOORE, C.E. and DAY, P.J. How Clonal is *Staphylococcus aureus*? **J. Bacteriol.** 2004. 17(3):638-680.
  45. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
  46. OLIVEIRA, D.C. and 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): 2155-2161.
  47. JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E. POLLARD, D.R. and ROZEE, K.R. 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):426-430.
  48. LINA, G; PIEMONT, Y; GODAIL-GAMOT, F; BES, M; PETER, MO; GAUDUCHON, V; VANDENESCH, F and ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999.29:1128-1132.
  49. ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L. and 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):2151-2156.
-

50. YAMAGUCHI, T.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, M.; FUDABA, Y.; AEPFELLBACHER, M.; TAKATA, T.; OHARA, M.; KOMATSUZAWA, H.; ANAGAI, M. and SUGAI, M. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island wich encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infec. and Immun.* 2002.70(10):5835-5845.
  51. JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J. and VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infec. and Immun.* 2002. 70(2):631-641.
  52. MARCONI, C.; CUNHA, M.L.R.S.; ARAUJO JR, J.P. and RUGOLO, L.M.S.S. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus spp.* **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**2005.11(2):117-128.
  53. CHUNG, M.; de LENCASTRE, H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A. and multilaboratory project collaborators. Molecular typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. **Microbial Drug Resistance.**2000.6(3):189/198.
  54. PFALLER, M.A. Molecular epidemiologic typing of nosocomial pathogens. Iowa city, ASCP Spring, September, teleconference Serie, 1993.
  55. HARRIS, A.D.; KARCHMER, T.B.; CARMELI, Y. and SAMORE, M.H. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. **Clin. Infect. Diseases.**2001. 32:1055-1061.
-

56. FORTALEZA, C.M.C.B.; FREIRE, M.P.; FILHO, D.C.M. and RAMOS, M.C. Risk factors for recovery of imipenem- or ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among admitted to a teaching hospital in Brazil. **Infect. Control and Hosp. Epidemiol.** 2006. 27(9):901-906.
  57. CHARLSON, M.E.; POMPEI, P.; ALES, K.L. and MACKENZIE, C.R. A new method of classifying prognostic co morbidity in longitudinal studies: development and validation. **J. Chron. Dis.**1997.40:373-383.
  58. KONEMAN EW, ALLEN, SD, JANDA, WM, SCHRECKENBERGER, PC, WINN JR, WC 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed., Lippincott, Philadelphia.
  59. COSGROVE, S.E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E.N.; SCWABER, M.J.; KARCHMER, A.W. and CARMELI, Y. Comparison of mortality associated with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta analysis. 2003.10:53-59.
  60. VELASCO, D., TOMAS, M.T., CARTELLE, M., BECEIRO, A., PEREZ, A., MOLINA, F., MOURE, R., VILLANUEVA, R., BOU, G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrobiol. Chemother.* 2005.55:379-382.
  61. CAUWELIER, B., GORDTS, B., DESCHEEMAECKEER, P. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30  $\mu$ g) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.. Dis.* 2004.23:389-392.
  62. CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997.10:781-91.
-

63. MARTY, V., MADIRAJU, V.S., BRUNNER, D.P., WILKINSON, B.J. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987.31:1727-1733.
  64. PETRELLI, D.; REPETTO, A.; D'ERCOLE, S.; ROMBINI, S.; RIPA, S.; PRENNA, M. and VITALI, L.A. Analysis os Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. *J. Med. Microbial.* 2008.57:364-372.
  65. Van DIJK, Y.; WIELDERS, CLC.; FLUIT, A.C.; PAAWN, A.; DIEPERSLOOT, R.J.A. and MASCINI, E.M. G. Genotyping of clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a Dutch teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40(2):663-665.
  66. PECK, K.R.; BAEK, J.Y.; SONG, J. and KO, K.S. Comparison of genotypes and enterotoxina genes between staphylococcus aureus isoales from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. *J. korean Med. Sci.* 2009.24(4):5858-591.
  67. PEREZ, L.R.R. e D'AZEVEDO, P.A. Clonal types and antimicrobial resistance profiles from hospitals in South Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2008.50.(3):135-137.
  68. BARTELS, M.D.; NANUASVILI, A.; BOYE, K.; KHAREBAVA, S. and WESTH, H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tbilisi, the Republic og Georgia, are variants of the Brazilian clone. *Eur. J. clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008. 27:757-760.
  69. SOUZA-JUNIOR, F.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERNANDES, M.J.B.C.; VIEIRA, M.F.P.; PELLEGRINO, F.L.P.C.; FIGUEIREDO, M.C.N.; MILAN. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. 2009. 42(10):877-81.
-

70. LAMARO-CARDOSO J, DE LENCASTRE H, KIPNIS A. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day-care centers in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(12):3991-7.
  71. ELLIS, M.W.; GRIFFITH, M.E.; JORGENSEN, J.H.; HOSPENTHAL, D.R.; MENDE, K.; PATTERSON, J.E. Presence and molecular epidemiology of virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing and infecting soldiers. 2009. *J. Clin. Microbiol.* 47(4):940-45.
  72. HIDRON AI, KOURBATOVA EV, HALVOSA JS. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(2):159-66.
  73. Von EIFF C, BECKER K, MACHKA K et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med.* 2001; 344(1):11-6.
  74. ROBICSEK A, SUSENO M, BEAUMONT JL et al. Prediction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involvement in disease sites by concomitant nasal sampling. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(2):588-92.
  75. VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E.; ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.*; 2003. 9: 978-984.
-

76. COOMBS, G.W.; NIMMO, G.R.; BELL, J.M.; HUYGENS, F.; O'BRIEN, F.G.; MALKOWSKI, M.J.; PEARSON, J.C.; STEPHENS, A.J.; AUSTRALIAN GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J. Clin. Microbiol.*, 2004.42:4735-4743.
  
  77. RIBEIRO, A.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BERQUO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, AM. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.*, 2005. 43:985-1988
  
  78. SCHUENCK, R.P.; NOUER, S.A.; WINTER, C.O.; CAVALCANTE, F.S.; SCOTT, T.D.; FERREIRA, A.L.P.; MARVAL, M.G. and SANTOS, K.R.N. Polyclonal presence of non-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diag. Microbio. Inf. Dis.* 2009.64(4):434-441.
  
  79. O'BRIEN, F.G.; LIM, T.T.; CHONG, F.N.; COOMBS, G.W.; ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; MONK, A.; SAID-SALIM, B.; KREISWIRTH, B.N.; GRUBB, W.B. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J. Clin. Microbiol.*; 2004.42:3185– 3190.
  
  80. NIMMO, G.R.; COOMBS, G.W.; PEARSON, J.C.; O'BRIEN, F.G.; CHRISTIANSEN, K.J.; TURNIDGE, J.D.; GOSBELL, I.B.; COLLIGNON, P.; MCLAWS, M.L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med. J. Aust.*; 2006. 17:384-388.
  
  81. KILIC, A.; LI, H.; STRATTON, C.W.; TANG, Y. Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome mec types of, as well as Pantone Valentine leukocidin occurrence among, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. 2006. *J. Clin. Microbiol.* 44(12): 4436-4440.
-

82. ELLINGTON, M.J.; HOPE, R.; GANNER, M.; GANNER, M.; EAST, C.; BRICK, G. and KEARNS, A.M. Is Panton-Valentine leucocidina associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteremia in the UK?. *J. Antimicrob. Chem.* 2007
83. WANNET, W. J. B.; SPALBURG, E.; HECK, M. E. O. C.; PLUISTER, G. N.; TIEMERSMA, E.; WILLEMS, R. J. L.; HUIJSDENS, X. W.; NEELING, A. J. AND ETIENNE, J. Emergence of Virulent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Panton-Valentine Leucocidin Genes in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 2005. 43(7): 3341-3345.
84. DAUWALDER, O.; LINA, G.; DURAND, G.; BES, M.; MEUGNIER, H.; JARLIER, V.; COIGNARD, B.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J; LAURENT, F. Epidemiology of invasive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007.2008. *J. Clin. Microbiol.* 46(10):3454-58.
85. NOGUCHI, N.; NAKAMINAMI, H.; NISHIJIMA, S.; KUROKAWA, I.; SO, H.; SASATSU, M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44:2119–2125.
86. ZHANG, K.; MCCLURE, J.; ELSAYED, S.; TAN, J. and CONLY, J.M. Coexistence of panton-Valentine leukocidin-positive and negative community associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. *J. Infec. Dis.* 2008. 197:195-204.
87. MARIA ADRIANA CATALDO, FABRIZIO TAGLIETTI NICOLA PETROSILLO. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A Community Health Threat. *Postgraduate Medicine.* 2010. 122(6).
-

88. CHEN, C.; HUANG, Y.; CHIU, C.; SU, L.; LIN, T. Clinical features and genotyping analysis of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwanese children. *Pediat. Infect. Dis. J.*, 2005. 24:40-45.
  89. TENOVER, F.C.; MCDOUGAL, L.K.; GOERING, R.V.; KILLGORE, G.; PROJAN, S.J.; PATEL, J.B.; DUNMAN, P.M. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2006. 44:108-118.
  90. DUFOUR, P.; GILLET, Y.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; FLORET, D.; ETIENNE, J. and RICHEL, H. Community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* 2002. 35:819-824.
  91. MIRANDA, O.P.; SILVA-CARVALHO, M.C., RIBEIRO, A., PORTELA, F., R. P. CORDEIRO, R.P., CAETANO, N., VIDAL, C. F. L AND FIGUEIREDO, A.M.S. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect* 2007. 13:1165–1172.
  92. BECKER, K.; FRIEDRICH, A.W.; LUBRITZ, G.; WEILERT, M.; PETERS, G.; von EIFF, C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxins superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. **J. Clin. Microbiol.** 2003.41(4):1434-1439.
  93. CAMPBELL, S.J.; DESHMUKH, H.S.; NELSON, C.L.; BAE, I.; RUDE, T.H.; COREY, R. and FOWLER JR, V.G. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J. Clin. Microbiol.* 2008.46.(2):678-684.
-

94. SCHMITZ, F.; MACKENZIE, C.R.; GEISELI, R.; SILVIA WAGNER, S.; IDEL, H.; VERHOEF, J.; HADDING, U. & HEINZ, H. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Eur J Epidemiol.* 1997.13:699–708.
  95. BUDIMIR, A.; DEURENBERG, R.H.; PLECKO, V.; VINK, C.; KALENIC, S. and STOBBERINGH, E.E. Molecular characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. *J. Antimicrob. Chem.* 2006. 57:331-334.
  96. LOMHOLT, H.; ANDERSEN, K.E. and KILIAN, M. *Staphylococcus aureus* clonal dynamics and virulence factors in children with atopic dermatitis. *J. invest. Dermatol.* 2005.125:977-982.
  97. DURAND, G.; BES, M.; MEUGNIER, H.; ENRIGHT, M.; FOREY, F.; LIASSINE, N.; WENGER, A.; KIKUCHI, K.; LINA, G.; VANDENESCH, F. and ETIENNE, J. Detection of new Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J. clin. Microbiol.* 2006. 44(3):847-853.
  98. GRINHOLC, M.; WEGRZYN, G. and KURLENDÁ, J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 2007. 50.(3):375-379.
  99. SATORRES, S.E. and ALCARÁZ, L.E. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Public Health.* 2007.15.(2):87–90.
-

100. YAZDANI, R.; OSHAGHI, M.; HAVAYI, A.; PISHVA, E.; SALEHI, R.; SADEGHIZADEH, M. AND FOROOHESH, H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. Iranian J Publ Health. 2006. 35(2):25-28.
  101. AMARAL, M.M.; COELHO, L.R.; FLORES, R.P.; SOUZA, R.R.; SILVA-CARVALHO, M.C.; TEIXEIRA, L.A.; FERRERIRA'CARVALHO, B.T. and FIGUEIREDO, A.M.S. The predominant variant of the Brazilian Epidemic clonal complex of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. J. Infec. Dis. 2005. 192:801-810.
  102. KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A. AND HENRI VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. Clin Microbiol Rev. 1997. 10.(3):505-520.
  103. GRAFFUNDER, E.M. and VENEZIA, R.A. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. J Antimicrob Chem . 2002. 49:999-1005.
  104. MARSHALL, C.; WOLFE, R.; KOSSMANN, T.; WESSELINGH, S.; HARRINGTON, G. e SPELMAN, D. Risk factors for acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by trauma patients in the intensive care unit. J Hosp Infect. 2004.57:245–252.
  105. HEO, S.T.; PECK, K.R.; RYU, S.Y.; KWON, K.T.; KO, K.S.; OH, W.S.; LEE, N.Y.; SONG, J. Analysis of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* blood isolates in an emergency department.2007. J. Korean Med Sci. 22:682-6.
-

106. CAVALCANTI, S.M.M.; FRANÇA, E.R.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; CABRAL, C.; MEDEIROS, A.C.R. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. 2006. Rev Bras Epidemiol. 9(4):436-446.
  107. COOK, N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* versus the burn patient. Burns. 1998.4: 91-98.
  108. MACEDO, J.L.S.; ROSA, S.C. MACEDO, K.C.S. AND CASTRO, C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. Rev. Col. Bras. Cir. 2005. .32(4):. 173-177.
  109. HUNT, J.L.; PURDUE, G.F. AND TUGGLE, D.W. Morbidity and mortality of an endemic pathogen: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am j. Surg. 1988. 156:524-528.
  110. OLIVO, T.E.T.; MELO, E.C.; ROCHA, C. and FORTALEZA, C.M.C.B. Risk factors for acquisition of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among patients from a burn unit in Brazil. Burns. 2009. 35:1104-1111.
  111. CHAUDHARY, U.; GOEL, N.; SHARMA, M.; GRIWAN, M.S.; KUMAR, V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection/colonization at the burn care unit of a medical school in India. 2007. J Infect Dis Antimicrob Agents. 24(1):29-32.
-



*Anexo*

Editorial Manager(tm) for Infection Control and Hospital Epidemiology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Genetic determinants of methicillin resistance and virulence among *Staphylococcus aureus* isolates recovered from clinical and surveillance cultures in a Brazilian teaching hospital.

Short Title: *S. aureus*: resistance, virulence factors and invasiveness

Article Type: Concise Communication

Keywords: *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistance; virulence factors; invasiveness

Corresponding Author: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Biosciences Institute, UNESP - Univ Estadual Paulista

First Author: Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues, M.Sci.

Order of Authors: Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues, M.Sci.; Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, M.D., Ph.D.; Camila Sena Martins Souza, M.Sci.; Natalia Bibiana Teixeira, M.Sci.; Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha, Ph.D.

---

---

\*Manuscript

**Title page**

1  
2  
3  
4 Title: Genetic determinants of methicillin resistance and virulence among  
5 *Staphylococcus aureus* isolates recovered from clinical and surveillance  
6 cultures in a Brazilian teaching hospital.  
7  
8

9  
10  
11 Short title: *S. aureus*: resistance, virulence factors and invasiveness  
12  
13

14  
15 Authors:

16 Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues<sup>1,2</sup>; Carlos Magno CB Fortaleza<sup>1</sup>; Camila  
17 Sena Martins Souza<sup>2</sup>; Natalia Bibiana Teixeira<sup>2</sup>; Maria de Lourdes R S  
18 Cunha<sup>2</sup>  
19  
20  
21

22  
23 Affiliations:

24  
25  
26 <sup>1</sup> Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu Medical  
27 School, UNESP – Univ Estadual Paulista. City of Botucatu, Brazil.  
28

29  
30 <sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP  
31 – Univ Estadual Paulista. City of Botucatu, Brazil.  
32  
33

34  
35  
36 Corresponding author:

37  
38 **Maria de Lourdes R S Cunha**

39 Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute

40 Unesp – Univ Estadual Paulista

41 Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, SP 18618-970 Brazil.

42 Phone: 55-14-3811 6050, Fax: 55-14-3815 3744

43 Email: [cunhamlr@ibb.unesp.br](mailto:cunhamlr@ibb.unesp.br)  
44  
45  
46  
47

48  
49  
50  
51 **Word count:** 715 words.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

**ABSTRACT**

1  
2 We studied the presence of virulence and methicillin-resistance genes among  
3 colonizing and invasive *Staphylococcus aureus* strains from a small teaching  
4 hospital. The presence of SCCmec types III and IV, as well as of genes  
5 coding for exfoliative toxin B and Panton Valentine Leukocidin, were  
6 independently associated with invasiveness.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13

14 **Key-words:** *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistance; virulence factors;  
15  
16 invasiveness  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## TEXT

1  
2  
3  
4 A comprehensive approach to *Staphylococcus aureus* epidemiology  
5 within healthcare settings should include the identification of reservoirs,  
6 transmission dynamics and invasiveness. The latter issue is of major interest.  
7 While many patients are asymptotically colonized with methicillin-  
8 susceptible (MSSA) or resistant (MRSA) *S. aureus*, only a few will develop  
9 infection.<sup>1</sup> However, previous studies have shown colonization as a major risk  
10 factor, or even a preceding stage of infection.<sup>2</sup>  
11  
12

13  
14  
15 We attempted to assess determinants of infection by comparing the  
16 proportion isolates recovered from surveillance and clinical cultures that  
17 harbored genes coding for virulence or methicillin resistance. The rationale of  
18 our study was that isolates from clinical cultures, which are collected upon the  
19 diagnosis of an infectious syndrome, may be representative of "invasive"  
20 strains.  
21  
22

23  
24  
25 The study was performed with isolates from Hospital Estadual Bauru  
26 (HEB), one of the teaching hospitals from Botucatu School of Medicine. The  
27 hospital has 285 active beds, distributed among four intensive care units  
28 (ICUs), one unit for burn patients and several medical, surgical and pediatric  
29 wards. Surveillance cultures (nasopharyngeal swabs) were routinely obtained  
30 upon patients admissions. In ICUs and burn units, those cultures were also  
31 performed weekly thereafter. For burn patients, besides nasopharyngeal  
32 swabs, specimens were obtained from burn wound and other body sites.  
33 Clinical cultures were collected upon medical indication.  
34  
35

36  
37  
38 We studied isolates provided by HEB's microbiology laboratory.  
39 Whenever one patient had more than one surveillance or clinical culture  
40 positive for *S. aureus*, only the first was included in the analysis. However, if  
41 that patient presented positivity both surveillance and clinical cultures, both  
42 isolates were analyzed. Several PCR-based methods were applied to identify  
43 virulence genes (Table 1).<sup>3,4,5,6</sup> Methicillin resistance was assessed by  
44 molecular identification and typing of *SCCmec*.<sup>7</sup> The proportion of isolates  
45 harboring specific strains was compared through univariate statistical tests:  
46 Chi-square and Fisher's Exact test. Later, all results were simultaneously  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

1 introduced in a single-step multivariable model (logistic regression). A p-value  
2 of 0.05 was set as significance limit.

3 A total of 309 isolates were included in the study, 225 (72.8%) from  
4 surveillance cultures and 84 (27.2%) from clinical specimens. The most  
5 frequent sites of surveillance cultures were: nasopharynx (59.6%), burn  
6 wound (22.7%) and oropharynx (10.2%). Among clinical specimens, blood  
7 (46.4%), wound secretions (33.3%) and tissue fragments (14.3%)  
8 predominated.

9 Results are summarized in **Table 2**. Briefly, we found an independent  
10 relation of *SCCmec* types III and IV and invasiveness. Also, invasive strains  
11 were more likely to harbor genes for exfoliative toxin b (*etb*) and the Panton  
12 Valentine leukocidin (*pvl*).

13 The finding of greater invasiveness among MRSA is not surprising.  
14 This may be partly due to direct and indirect ("populational") ecological  
15 pressure of antimicrobial use.<sup>8</sup> Also, other clinical factors, such as greater  
16 severity-of-illness and length-of-stay in the hospital are both risk factors for  
17 healthcare-acquired infection and for MRSA acquisition.

18 On the other hand, *pvl* lysis of leukocytes may act as a mechanism for  
19 evasion from immune response, facilitating *S. aureus* survival and tissue  
20 invasion.<sup>9</sup> Of note, we found *pvl* genes in 33 out of 203 *SCCmec* III and in 3  
21 out of 9 *SCCmec* IV-harboring isolates. This difference did not reach  
22 statistical significance. None of the MSSA strains was positive for *pvl*.

23 The finding of a relation between *etb* and invasiveness was rather  
24 puzzling. This gene was equally distributed among MSSA (3.1%) and MRSA  
25 (4.1%) isolates. It was found in 3 out of 40 isolates from blood cultures and in  
26 4 out of 28 isolates from wound secretions. We can only hypothesize that  
27 superantigenic action may improve invasiveness. Of note, *etb* surpasses *eta*  
28 in pyrogenic activity.<sup>10</sup>

29 Of course, our results should be improved by confronting molecular  
30 results with clinical and epidemiological data. Tough it was not the main  
31 objective of our study, we revised all MRSA cases in order to identify  
32 community-acquired strains. We found out that 15 (out of 220) MRSA-positive  
33 patients had positive cultures upon admission and did not refer any previous  
34 contact with healthcare settings in the last year. Among the isolates, 14

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

harboured SCCmec III and only one SCCmec IV. This is a starting point for further research. Still, our results point out to a role of both virulence factors and methicillin resistance in the transition from colonization to infection. The early identification of those genes among colonized patients may delimitate a group of patient deserving more intensive application of infection control measures.

### AKNOWLEDGMENT

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Sao Paulo State Agency for Research Support).

### REFERENCES

1. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996; 17: 47-52.
2. Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am J Med.* 2008; 121: 310-5.
3. 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: 426-30.
4. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:1128-32.
5. Arciola CR, Baldassari 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: 2151-6.
6. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70:631-41.
7. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 2155-61.

8. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8:347-54.
9. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 2007; 87: 3-9.
10. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2010; 2: 1148-65.

**Table 1.** List of virulence factors assessed in the study, alongside with the genes tested and the methods references.

| Virulence factors                           | Genes        | Reference                         |
|---|--------------|-----------------------------------|
| Enterotoxins                                | <i>sea</i>   | Johnson et al (1991) <sup>3</sup> |
|   | <i>seb</i>   |                                   |
|   | <i>sec-1</i> |                                   |
| Staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin 1 | <i>tst</i>   |                                   |
| Panton-Valentine Leukocidin                 | <i>LukPV</i> | Lina et al (1999) <sup>4</sup>    |
| Biofilm production                          | <i>icaA</i>  | Arciola et al (2001) <sup>5</sup> |
|   | <i>icaD</i>  |                                   |
| Exfoliative toxins                          | <i>eta</i>   | Johnson et al (1991) <sup>3</sup> |
|   | <i>etb</i>   |                                   |
|   | <i>etd</i>   |                                   |
| Hemolysins                                  | <i>hla</i>   | Jorraud et al (2002) <sup>6</sup> |
|   | <i>hld</i>   |                                   |

**Table 2.** Results of univariate and multivariable analysis of molecular predictors for invasiveness among *S. aureus* strains.

| Genes                         | Univariate             |                             |                            | Multivariable |                          |              |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------|--------------------------|--------------|
|                               | Clinical Cultures (84) | Surveillance cultures (225) | OR (95%CI)                 | P             | OR (95%CI)               | P            |
| <b><i>SCCmec</i></b>          |                        |                             |                            |               |                          |              |
| Absence (reference)           | 14 (16.7)              | 75 (33.3)                   | reference                  | ...           | reference                | ...          |
| type II                       | 4 (4.8)                | 1 (0.4)                     | <b>21.43 (2.22-206.26)</b> | <b>0.004</b>  | 10.79 (0.95-122.14)      | 0.06         |
| type III                      | 59 (70.2)              | 44 (19.6)                   | <b>2.19 (1.15-4.18)</b>    | <b>0.02</b>   | <b>2.19 (1.08-4.45)</b>  | <b>0.03</b>  |
| type IV                       | 7 (8.3)                | 5 (2.2)                     | <b>7.50 (2.08-27.02)</b>   | <b>0.003</b>  | <b>5.28 (1.35-20.63)</b> | <b>0.02</b>  |
| <b><i>Virulence Genes</i></b> |                        |                             |                            |               |                          |              |
| <i>tst</i>                    | 19 (22.6)              | 28 (12.4)                   | <b>2.06 (1.08-3.93)</b>    | <b>0.03</b>   | 1.36 (0.65-2.84)         | 0.41         |
| <i>sea</i>                    | 20 (23.8)              | 60 (26.7)                   | 0.86 (0.38-1.54)           | 0.61          | 1.16 (0.57-2.33)         | 0.69         |
| <i>seb</i>                    | 22 (26.2)              | 43 (19.1)                   | 1.50 (0.83-2.71)           | 0.17          | 1.64 (0.85-3.16)         | 0.14         |
| <i>sec1</i>                   | 20 (23.8)              | 75 (33.3)                   | 0.63 (0.34-1.11)           | 0.11          | 0.55 (0.27-1.10)         | 0.09         |
| <i>eta</i>                    | 2 (2.4)                | 1 (0.4)                     | 5.46 (0.49-61.06)          | 0.18          | 3.57 (1.48-27.46)        | 0.32         |
| <i>etb</i>                    | 8 (9.5)                | 4 (1.8)                     | <b>5.82 (1.70-19.86)</b>   | <b>0.002</b>  | <b>6.38 (1.48-27.46)</b> | <b>0.01</b>  |
| <i>etd</i>                    | 2 (2.4)                | 0 (0.0)                     | undefined                  | 0.07          | undefined*               | 0.99         |
| <i>pvl</i>                    | 21 (25.0)              | 25 (11.1)                   | <b>2.67 (1.40-5.09)</b>    | <b>0.002</b>  | <b>2.38 (1.16-4.86)</b>  | <b>0.02</b>  |
| <i>ica A</i>                  | 80 (95.2)              | 220 (97.8)                  | 0.46 (0.12-1.74)           | 0.26          | 0.71 (0.14-3.71)         | 0.69         |
| <i>ica D</i>                  | 84 (100.0)             | 216 (96.0)                  | undefined                  | 0.12          | undefined*               | 0.99         |
| <i>hla</i>                    | 84 (100.0)             | 223 (99.1)                  | undefined                  | 1.00          | undefined*               | 0.99         |
| <i>hld</i>                    | 84 (100.0)             | 225 (100.0)                 | undefined                  | 1.00          | not included**           | not included |

Note. Cases are in number(%). Significant results are presented in boldface. All variables were dichotomic except *sccMec* (which was analyzed as a dummy variable, with absence as reference category) OR, Odds Ratio. CI, Confidence Interval. \* CI ranging from zero to infinite. \*\*Not included due to presence in all analyzed isolates.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49