



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

**Nathalia Bibiana Teixeira**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA**  
**CARREAMENTO NASAL E OROFARÍNGEO DE**  
*Staphylococcus aureus* **EM DIABÉTICOS INSULINO-**  
**DEPENDENTES NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP.**

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

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

Coorientador: Prof. Associado Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

**Botucatu**

**2019**

Nathalia Bibiana Teixeira

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA  
CARREAMENTO NASAL E OROFARÍNGEO DE  
*Staphylococcus aureus* EM DIABÉTICOS  
INSULINO-DEPENDENTES NO MUNICÍPIO DE  
BOTUCATU, SP.

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

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

Coorientador: Prof. Associado Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRE 8/7500

Teixeira, Nathalia Bibiana.

Prevalência e fatores de risco para carreamento nasal e orofaríngeo de *Staphylococcus aureus* em diabéticos insulino-dependentes no município de Botucatu, SP. / Nathalia Bibiana Teixeira. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha  
Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza  
Capes: 20202008

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Drogas - Resistência. 3. Fatores de virulência. 4. Diabetes mellitus. 5. Tipagem molecular.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; *Staphylococcus aureus*; resistencia; tipagem molecular; virulencia.

**Nathalia Bibiana Teixeira**

Prevalência e fatores de risco para carreamento nasal e orofaríngeo de *Staphylococcus aureus* em diabéticos insulino-dependentes no município de Botucatu, SP.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

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

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

Comissão examinadora:

---

Profa. Adj. Lenice do Rosário de Souza  
Faculdade de Medicina de Botucatu

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante  
Faculdade de Medicina de Botucatu

---

Lígia Maria Abraão  
Serviço de Controle de Infecção da Regional São Paulo

---

Denise Brandão de Assis  
Universidade de São Paulo

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

## ***Dedicatória***

***À minha mãe, Rosana Aparecida de Oliveira e à minha tia, Luciana Lucchesi***

*Obrigada por serem meu exemplo de força, amor e dedicação! Por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos e por me darem condições de cultivar meus sonhos! Essa conquista eu devo a vocês!*

***Ao meu filho, Thomaz***

*Obrigada por ser tão corajoso, paciente e doce. Por ser a minha luz!*

***Ao meu esposo, Pedro Luiz da Silva Junior***

*Por todos esses anos de companheirismo e amor, por sempre me apoiar em meus projetos e estar comigo em qualquer caminhada.*

***Amo vocês!!!***

## *Agradecimentos*

*A Deus e à Nossa Senhora por me permitirem sentir Sua presença constante em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos, **Bianca Di Carla Teixeira** e **Neto Teixeira** por serem os irmãos mais perfeitos, cheios de defeitos que alguém poderia ter. Sem vocês a vida não teria a menor graça.*

*À minha irmã postiça, **Bruna Lucchesi** por estar sempre ao meu lado nas horas mais impossíveis com seu jeito divertido e irritado de ser. Te amo demais.*

*Ao meu pai, **Carlos Eduardo Teixeira** por me mostrar que nessa vida tudo é possível, nada está fora do nosso alcance, basta ter esperança.*

*Aos meus amados sobrinhos, **Julia Teixeira Koch**, **João Gabriel Teixeira Antunes**, **Manuela Lessa** e **Augusto Lessa**, por nunca me deixarem esquecer do que realmente importa. Demonstrando com sua inocência que a felicidade está nas coisas mais simples.*

*À minha querida orientadora, **Profa. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha** por todos esses anos de ensinamentos, confiança, paciência e oportunidades que me deu em seu laboratório. Por ter me acolhido de volta depois do mestrado. Por ter me dado tamanha liberdade para realizar meu projeto de doutorado. Por ser uma excelente profissional e ainda sim demonstrar carinho e respeito por seus alunos. Deus a abençoe imensamente!*

*Ao **Prof. Adj. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza** por todo conhecimento compartilhado durante o doutorado, pela paixão que demonstra ao ensinar e pela disposição em me ajudar sempre que precisei.*

*A banca de qualificação, Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcanti e Rodrigo Tavanelli*

*Hernandes pelas valiosas contribuições para o trabalho.*

*À Dra Bibiana Prada de Camargo Colenci por ter abraçado a idéia do projeto e auxiliado de forma indireta e diretamente doando um espaço em seu consultório para realização das coletas.*

*À profa. Dra. Teruê Sadatsume pela constante torcida, pelas brincadeiras, pelo carinho que demonstrou durante todos os anos de convivência. Sempre será A Professora Teruê, pra mim.*

*À Thais Aline Monteiro Pereira e a Paula Maria da Silva Monteiro Pereira, por serem meus anjos da guarda durante todo o projeto, colocando as minhas necessidades acima das delas, muitas vezes, para que o número de amostras fosse obtido e o trabalho concluído.*

*À Thais Alves Barbosa, por ser a melhor amiga que a pós-graduação me deu. Por sua prontidão em ajudar, seu carinho e alegria contagiante no laboratório. Você mora no meu coração!*

*À Camila Sena Martins de Souza, por ser a mesma pessoa querida de sempre, mesmo não convivendo mais diariamente comigo. Sua alegria me faz muita falta!*

*À Monica Luzia Leonel e Camila Lopes de Andrade, por fazerem meus dias fora do laboratório sempre muito divertidos. Pela amizade de tantos anos e pela cumplicidade. É muito bom saber que eu tenho vocês na minha vida!*

*Aos colegas de laboratório, Ana Cláudia Moro, Elka Ferreira, Lucas Porangaba da Silva, Mariana Poianas Silva e Carolina Destro de Angelis por toda cumplicidade, alegria e momentos de descontração durante nossos dias de trabalho.*

*Aos queridos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Larissa Ragozo, Luiz Alquati, Ivana Castilho, Aline Missio, Rafael Capra, Silvia Helena Ferreira, Luiz dos Santos e Ana Claudia Acerra por tornarem o meu dia-a-dia mais leve e feliz. Obrigada por toda ajuda sempre que precisei!*

*À secretária da Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Bruna Quirino Jorgetto, por estar sempre disposta a me ajudar e por toda paciência e consideração demonstrada ao longo do doutorado.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio disponibilizado, essencial para a realização desse trabalho.*

*Finalmente, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho. Na impossibilidade de nomear cada um, deixo aqui meu reconhecimento e gratidão a todos.*

*Muito obrigada!*

*“A educação é a arma mais poderosa que você  
pode usar para mudar o mundo.”*

*Nelson Mandela*

## RESUMO

Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* representam um dos principais problemas de saúde pública, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade principalmente entre indivíduos com deficiência de sistema imunológico como os diabéticos, em especial aqueles que fazem uso diário de insulina. Além da alta patogenicidade e facilidade de aquisição de resistência aos antimicrobianos, o patógeno tem grande habilidade de colonizar indivíduos de forma assintomática, favorecendo sua disseminação e tornando esses indivíduos fonte de risco para infecções. O estudo teve como objetivo analisar a prevalência e fatores de risco para o carreamento nasal e orofaríngeo, bem como caracterizar o perfil de resistência, virulência e tipagem molecular de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) isolados de indivíduos diabéticos insulino-dependentes do município de Botucatu, SP. *S. aureus* foram obtidos da nasofaringe e orofaringe de 312 indivíduos diabéticos insulino-dependentes da comunidade e analisados quanto à presença do gene *mecA*, genes das enterotoxinas (*sea*, *seb*, e *sec-1*), esfoliatinas A e B (*eta* e *etb*), toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina Pantón–Valentine (*pvl*), hemolisinas alfa (*hla*) e delta (*hld*) e biofilme (operon *icaADBC*) através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e a tipagem do SCC*mec* através de PCRmultiplex. O perfil de sensibilidade à oxacilina, cefoxitina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e sulfametoxazol/trimetoprim foi realizada pelo método do disco-difusão e a concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina foi determinada pelo método do *E-test*. A tipagem molecular dos isolados foi identificado através da técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e pela técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*). Para análise dos fatores de risco foi aplicado um questionário contendo dados demográficos e clínicos que posteriormente foram analisados por modelo de regressão logística para determinar fatores de risco associados ao carreamento de *S. aureus* MRSA. A prevalência de colonização global de *S. aureus* e MRSA foi de 30,4% e 4,8%, respectivamente. Dos 112 isolados de *S. aureus*, 15 tinham o gene *mecA*, sendo que 10 carream o SCC*mec* do tipo IV, três carream o SCC*mec* do tipo I e dois isolados carream o SCC*mec* do tipo II. Dos 15 isolados resistentes (MRSA), sete apresentaram

sensibilidade à oxacilina e quatro apresentaram sensibilidade à cefoxitina pelo método de disco-difusão. Nenhum dos isolados de *S. aureus* apresentou resistência à linezolida, quinupristina/dalfopristina e vancomicina, enquanto que um isolado de MSSA, apresentou resistência à sulfametoxazol/trimetoprim. A análise dos fatores de risco para carreamento de *S. aureus* revelou associação negativa com idade e doença pulmonar, enquanto que úlcera de membros inferiores foi fator de risco. Para carreamento de MRSA apenas o sexo masculino foi associado significativamente como fator de risco na análise multivariada. Quanto à análise do perfil de virulência notou-se alto potencial patogênico tanto de isolados de MSSA quanto de MRSA, com maior prevalência de genes relacionados à produção de biofilme (genes *icaA* e *icaD*), enterotoxina A (gene *sea*) e as hemolisinas alfa (gene *hla*) e delta (gene *hld*). Não foram encontrados isolados carreando os genes da esfoliatina B e *pvl*. A tipagem molecular demonstrou a formação de *clusters* entre isolados MRSA de pacientes diferentes com presença de ST5 e ST8. Entre os MRSA e MSSA foram identificados isolados carreando o ST398, sugerindo disseminação dessa linhagem entre a população do estudo. Nossos achados reforçam a importância de estudos epidemiológicos de colonização, principalmente em populações de risco aumentado para infecções, como é o caso dos diabéticos, uma vez que além da alta prevalência de MRSA, notou-se também isolados sensíveis virulentos colonizando a mucosa nasal e garganta desses indivíduos, fato que pode contribuir para transmissão, aumento do risco de infecções graves e dificuldade no tratamento.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, resistência, virulência, diabetes mellitus, perfil clonal, PFGE, MLST.

## ABSTRACT

Infections caused by *Staphylococcus aureus* is a major public health problem and infections with this microorganism are associated with high morbidity and mortality rates, especially among individuals with immune deficiency disorders such as diabetes and particularly those who take insulin daily. In addition to its high pathogenicity and ability to acquire antimicrobial resistance, asymptomatic infection with this pathogen is common, favoring its dissemination and rendering these individuals a source of infection. The objective of this study was to analyze the prevalence and risk factors for nasal and oropharyngeal carriage, as well as to characterize the resistance profile, virulence, clonal profile and sequence type of methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from insulin-dependent diabetic individuals in the city of Botucatu, SP, Brazil. *Staphylococcus aureus* was collected from the nasopharynx and oropharynx of 312 community insulin-dependent diabetic individuals. The isolates were analyzed for the presence of the *mecA*, enterotoxin (*sea*, *seb* and *sec-1*), exfoliatin A and B (*eta* and *etb*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), Panton-Valentine leukocidin (*pvl*), alpha and delta hemolysin (*hla* and *hld*), and biofilm (*icaADBC* operon) genes by the polymerase chain reaction (PCR). SCC*mec* typing was performed by multiplex PCR. The susceptibility profile against oxacillin, cefoxitin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and sulfamethoxazole/trimethoprim was evaluated by the disc diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin was determined by the E-test. The clonal profile of the isolates was characterized by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) was used to obtain the sequence types of the isolates. The risk factors associated with *S. aureus* and MRSA carriage were determined by applying a questionnaire containing demographic and clinical data and subsequent logistic regression analysis. The overall prevalence of colonization with *S. aureus* and MRSA were 31.45% and 4.81%, respectively. Fifteen of the 112 *S. aureus* isolates carried the *mecA* gene; SCC*mec* type IV was identified in 10 isolates, SCC*mec* type I in three, and SCC*mec* type II in two. Among the 15 resistant isolates (MRSA), seven were susceptible to oxacillin and four to cefoxitin by the disc diffusion method. None of the *S. aureus* isolates was resistant to linezolid, quinupristin/dalfopristin or vancomycin,

whereas one MSSA isolate was resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim. The analysis of risk factors revealed a negative association with age and lung disease, while leg ulcers were a risk factor for *S. aureus*. For MRSA, only male gender was significantly associated as a risk factor in multivariate analysis. Evaluation of the virulence profile showed a high pathogenic potential of both MSSA and MRSA isolates, with a higher prevalence of biofilm production (*icaA* and *icaD*), enterotoxin A (*sea*), and alpha and delta hemolysin (*hla* and *hld*) genes. None of the isolates carried the exfoliatin B or *pvl* gene. Clonal profile analysis demonstrated the formation of clusters among MRSA isolates from different patients, with the identification of ST5 and ST8. Isolates carrying ST398 were identified among MSSA and MRSA, suggesting dissemination of this lineage in the population studied. Our findings reinforce the importance of epidemiological studies of *S. aureus* colonization, especially in populations at high risk of infections such as diabetics. In addition to the high prevalence of MRSA, virulent susceptible isolates were found colonizing the nasal mucosa and throat of these individuals, a fact that may contribute to transmission, increase the risk of severe infections, and compromise treatment.

**Key-words:** *Staphylococcus aureus*, resistance, virulence, diabetes mellitus, clonal profile, PFGE, MLST

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Prevalência de colonização por <i>S. aureus</i> em pacientes com Diabetes melittus (DM) em diferentes estudos.....	10
<b>Tabela 2.</b> Prevalência de colonização por <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA) em pacientes com Diabetes melittus (DM) em diferentes estudos.....	10
<b>Tabela 3.</b> Caracterização do população de diabéticos insulino-dependentes incluídos no estudo (ANEXO III).....	78

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	06
<b>2. Justificativa</b> .....	12
<b>3. Objetivos</b> .....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
<b>4. Referências</b> .....	14
<b>5. Apresentação da tese</b> .....	19
5.1 Artigo I.....	20
5.2 Artigo II.....	49
<b>6. Conclusões</b> .....	75
<b>Anexo I</b> .....	76
<b>Anexo II</b> .....	77
<b>Anexo III</b> .....	94
<b>Anexo IV</b> .....	96
<b>Anexo V</b> .....	97

## 1. Introdução

*Staphylococcus aureus* é reconhecidamente um importante patógeno relacionado tanto a infecções hospitalares quanto comunitárias, com elevada taxa de morbidade e mortalidade, representando um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).<sup>1,2</sup>

As infecções por *S. aureus* atingem desde tecidos superficiais até os mais profundos quando penetram pelas barreiras naturais, podendo estar associados à doença de pele e tecidos moles, ou às infecções sistêmicas graves como endocardites, pneumonia, meningite, síndrome do choque tóxico e sepse que podem levar à morte.<sup>3-5</sup>

O fato de o patógeno ser tão bem-sucedido em sua disseminação e patogenicidade está relacionado com numerosos fatores de virulência expressos pela bactéria, os quais possibilitam a adesão à superfície, danos celulares, ou evasão do sistema imune somados a uma grande habilidade de adaptação e desenvolvimento de resistência a antimicrobianos.<sup>2,6</sup>

A adesão às superfícies celulares é realizada através de diversas adesinas, proteínas ancoradas à parede celular, denominadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) que reconhecem componentes da matriz extracelular e do plasma sanguíneo do hospedeiro incluindo fibrinogênio, fibronectina, fibroblasto e colágeno.<sup>7,8</sup> Além disso, *S. aureus* expressa um grande número de enzimas como nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase, as quais convertem o tecido hospedeiro local em nutrientes para o crescimento bacteriano.<sup>9</sup>

Dentre os diversos fatores de virulência produzidos por *S. aureus*, destacam-se as toxinas estafilocócicas, as quais podem ser subdivididas em agentes com atividade citolítica como as hemolisinas (alfa, beta, gama, delta) e a leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) que promovem a abertura de poros na membrana plasmática das células, causando vazamento do conteúdo celular e lise<sup>10-12</sup> e as exotoxinas com propriedade de superantígeno, que incluem a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) que são associadas a quadros de intoxicação alimentar, denominadas de A-E, G-I, R, S e T e as toxinas esfoliativas (ETs) denominadas A e B, ligadas a Síndrome da Pele Escaldada.<sup>13-15</sup>

Outro determinante de virulência importante é sua capacidade de produzir um polissacarídeo extracelular (biofilme) que possibilita a aderência da bactéria sobre superfícies plásticas e lisas, como cateteres, válvulas cardíacas, marcapassos e próteses

articulares. A produção desse polissacarídeo denominado “*Polysaccharide Intercelular Adhesin*” (PIA), é mediada por genes organizados em uma estrutura operon denominada “*intercelular adhesion*” (*icaADBC*). O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e agentes antimicrobianos<sup>16-19</sup>

Na década de 1940, a penicilina foi introduzida no tratamento para as infecções causadas por *S. aureus*. Entretanto, 20 anos depois, 80% dos isolados eram resistentes à droga, por ação das  $\beta$ -lactamases que inativam a penicilina pela ruptura do anel  $\beta$ -lactâmico.<sup>10</sup>Foi então introduzida a meticilina, primeira penicilina semissintética que não era susceptível a ação das  $\beta$ -lactamases, e apenas um ano depois, a primeira cepa resistente, denominada *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), foi isolado no Reino Unido. Desde então isolados MRSA tornaram-se uma das principais causas de infecções hospitalares em todo mundo<sup>20</sup>.

A resistência à meticilina é determinada pelo gene *mecA*, localizado em um complexo genético móvel chamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*). Esse gene (*mecA*) codifica para modificações no receptor do  $\beta$ -lactâmico, estimulando a produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP 2a ou PBP 2') com baixa afinidade pelo antibiótico, resultando em resistência.<sup>21,22</sup>As PBP's estão envolvidas na síntese da parede celular e muitos antimicrobianos atuam nessas proteínas, inativando a síntese completa da parede celular e consequentemente ocasionando a morte da bactéria.<sup>23,24</sup>

Até o momento, foram descritos treze tipos de SCC*mec* para *S. aureus*, com base na combinação de dois complexos: o complexo *ccr* composto por três genes (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*) e o complexo *mec* que possui 6 classes (classe A, B, C1, C2, D e classe E).<sup>22,25</sup>

Uma propriedade fundamental de *S. aureus* é sua habilidade de colonizar pessoas saudáveis de forma assintomática. As narinas anteriores são consideradas o sítio de colonização primária de *S. aureus*, sendo encontrados em aproximadamente 30% dos indivíduos<sup>26</sup>. Esses indivíduos apresentam um maior risco de desenvolver infecções pela bactéria e são uma importante fonte de disseminação do patógeno, particularmente devido a um aumento da prevalência de MRSA.<sup>27,28</sup>

Nos anos de 2001 e 2002, prevalência de carreamento nasal de 32,4% de *S. aureus* e 0,8% de MRSA foram encontradas em indivíduos com idade acima de um ano, em inquérito norte-americano de base populacional, *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), utilizando uma amostra representativa da população

civil não institucionalizada dos Estados Unidos.<sup>29,30</sup> Resultados similares foram obtidos em estudo também de base populacional realizado no Brasil, na cidade de Botucatu, SP, com prevalência de 32,7% de *S. aureus* e 0,9% de MRSA.<sup>31</sup>

Além das narinas, estudos revelam a presença de *S. aureus* no trato respiratório superior, como a faringe e as amígdalas.<sup>5</sup> Em estudos conduzidos por Partida et al<sup>32</sup>, a colonização da garganta ocorreu com maior frequência do que a colonização das narinas. Esse fato pode prejudicar o controle da disseminação de *S. aureus*, uma vez que, a colonização da garganta pode escapar da triagem de rotina.

Estudos demonstram através da tipagem de *S. aureus* de sítios infectados que na maioria das vezes, o isolado clínico é o mesmo observado previamente na cultura das narinas, demonstrando que *S. aureus* na mucosa nasal serve de reservatório para colonização em outros sítios.<sup>33</sup>

É reconhecido que pessoas que frequentemente usam agulhas, como para administração de insulina ou uso de drogas apresentam taxas maiores que outros indivíduos, variando de 24,1% a 76,4% e média de 56,4%.<sup>26</sup> Estudos demonstram que a taxa de colonização nasal por *S. aureus* é maior em pacientes diabéticos do que em não diabéticos<sup>28</sup>, e que o diabetes mellitus é um importante fator de risco para a colonização e infecção por MRSA.

Infecções em indivíduos diabéticos são reconhecidas como causas frequentes de morbidade e mortalidade.<sup>34,35</sup> Segundo a Federação Internacional do Diabetes, no ano de 2017 a prevalência global de portadores de diabetes Mellitus foi estimada em 374 milhões de pessoas, equivalendo à 7,7% da população mundial, com idades entre 18 e 99 anos. Ainda em 2017, aproximadamente 5 milhões de mortes foram atribuídas ao diabetes e suas complicações entre pessoas de 20 a 99 anos.<sup>36</sup> No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que existam cerca de 11 milhões de portadores de diabetes, sendo que 7,5 milhões já sabem que tem a doença.<sup>37</sup>

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) acomete aproximadamente de 5-10% da população de diabéticos. Sua incidência varia de acordo com a geografia, sendo mais prevalente em alguns países europeus. No Brasil, a incidência é de sete pacientes a cada 100.000 habitantes. Os sintomas do diabetes mellitus tipo 1 surgem geralmente na infância e adolescência com o ataque do sistema imunológico sobre as células beta do pâncreas, fazendo com que pouco ou nenhuma insulina seja liberada, tornando os pacientes dependentes de insulino terapia por toda a vida.<sup>36,37</sup>

Já a Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) ocorre com maior frequência em pessoas obesas com mais de 40 anos de idade embora na atualidade esteja sendo verificada com maior frequência em jovens, em virtude de maus hábitos alimentares, sedentarismo e stress. Neste tipo da doença encontra-se a presença de insulina, porém sua ação é dificultada pela obesidade, o que é conhecido como resistência insulínica, uma das causas de hiperglicemia. Por ser pouco sintomático, o diabetes, na maioria das vezes, permanece por muitos anos sem diagnóstico e sem tratamento o que favorece a ocorrência de suas complicações. Pessoas com diabetes tipo 2, muitas vezes pode gerenciar inicialmente sua condição através de exercícios e dieta. No entanto, ao longo do tempo a maioria das pessoas vai exigir drogas orais ou insulina<sup>36,37</sup>

Pacientes diabéticos são mais susceptíveis às infecções persistentes, principalmente infecções de pele como as causadas por *S. aureus*, devido ao aumento dos níveis de glicose sanguínea e supressão da resposta imune. Além disso, é muito comum nesses pacientes, o surgimento de feridas de cicatrização lenta devido à presença de neuropatias e diminuição do fluxo sanguíneo nas extremidades do corpo.<sup>38</sup>

Vários estudos documentaram um risco aumentado de infecções de pele e membranas mucosas de pacientes com diabetes<sup>39-42</sup>, embora estes estudos possam ser criticados por causa da seleção não controlada dos pacientes. Para evitar o viés de seleção e de confundimento, Muller et al<sup>43</sup> realizaram um estudo de coorte prospectivo com acompanhamento dos pacientes por um período de 12 meses, incluindo 705 pacientes adultos que tinham DM1 e 6.712 pacientes adultos que apresentavam DM2 com 18.911 pacientes controle que tinham hipertensão sem diabetes. Os resultados mostraram que ambos os pacientes com DM1 e aqueles com DM2 apresentavam maior risco para infecções bacterianas de pele, sendo que pacientes com DM1 tinham um risco maior de recorrência. O maior risco no grupo DM1 pode ser explicado por uma frequência maior de carreadores de *S. aureus* encontrada em diabéticos insulino-dependentes. Muller et al<sup>43</sup> também verificaram que pacientes com DM1 e DM2 apresentaram maior risco de infecção do trato respiratório inferior, infecção do trato urinário e de membranas mucosas.

Taxas de colonização por *S. aureus* foram maiores em diabéticos tratados com insulina do que os pacientes não diabéticos em estudos de Smith et al<sup>44</sup> (54 vs 34%, RR= 1.6,  $p<0,05$ ), Tuazón et al<sup>45</sup> (23 vs 4%, RR= 6.3,  $p<0,05$ ) e Chandler e Chandler<sup>46</sup>(53 vs 17%, RR= 3.2,  $p<0,05$ ). Dados de outros estudos da prevalência de *S.*

*aureus* e MRSA em pacientes diabéticos podem ser verificados na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Prevalência de colonização por *S. aureus* em pacientes com Diabetes melittus (DM) em diferentes estudos.

<b>Autores</b>	<b>Local do estudo</b>	<b>Ano</b>	<b>Prevalência de <i>S. aureus</i> em DM (%)</b>
Lipsky et al <sup>48</sup>	Seattle (EUA)	1987	30,5
Boyko et al <sup>49</sup>	Seattle (EUA)	1889	34,1
Ahluwalia et al <sup>50</sup>	Índia	2000	56,6
Graham et al <sup>51</sup>	New York (EUA)	2006	30,2
Tamer et al <sup>52</sup>	Turquia	2006	35,3
Kutlu et al <sup>53</sup>	Turquia	2012	41,9
Alizargar et al <sup>47</sup>	Iran	2013	42,5

Fonte: Alizargar et al<sup>47</sup>

**Tabela 2.** Prevalência de colonização por *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) em pacientes com Diabetes melittus (DM) em diferentes estudos.

<b>Autores</b>	<b>Local do estudo</b>	<b>Ano</b>	<b>Prevalência de MRSA em DM (%)</b>
Hidron et al <sup>54</sup>	Atlanta (EUA)	2005	10,2
Duran et al <sup>55</sup>	Turquia	2006	0
Graham et al <sup>51</sup>	New York (EUA)	2006	2,4
Baykan et al <sup>56</sup>	Turquia	2009	3,8
Kutlu et al <sup>53</sup>	Turquia	2012	9,9
Alizargar et al <sup>47</sup>	Iran	2013	24,7

Fonte: Alizargar et al<sup>47</sup>

As características associadas à colonização por *S. aureus* não são bem definidas. Algumas evidências sugerem que hospitalização recente pode aumentar a incidência de colonização nasal por *S. aureus*.<sup>48</sup> Outro fator potencialmente associado com colonização por *S. aureus* é o uso repetido de injeções com agulhas para a terapia com insulina. No entanto, alguns estudos sugerem que este não é o caso.<sup>46, 48, 57</sup>

Estudo realizado por Alizargar et al<sup>47</sup> encontrou somente a terapia com insulina como fator de risco significativo para colonização por MRSA ( $p < 0.05$ ), sendo que de 191 pacientes com a terapia com insulina, 95 (49,7%) estavam colonizados com MRSA.

Berman et al<sup>57</sup> em estudo para determinação da taxa de colonização por *S. aureus* e MRSA em usuários de droga intravenosa (IV), não usuários de droga IV, indivíduos submetidos à diálise e diabéticos verificaram que esses grupos apresentaram a mesma taxa de colonização por *S. aureus* encontrada em não usuários de droga IV e estudantes de medicina. Entretanto, MRSA foram isolados de 40 (29,2%) de 137 usuários de droga IV, 7(5,6%) de 124 não usuários de drogas IV, 5(22,7%) de 22 pacientes em diálise, 6 (18,2%) de 33 diabéticos e 3 (5,2%) de 58 estudantes de medicina. A diferença na colonização por MRSA entre usuários de droga IV e não usuários foi altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Pacientes diabéticos insulino-dependentes e pacientes em diálise também exibiram taxas maiores de colonização com MRSA do que não usuários de droga IV. Segundo os autores estes resultados sugerem que o uso de agulhas não é um fator de risco para aquisição de *S. aureus*, e a alta taxa de MRSA entre usuários de droga IV já era esperada por causa das altas taxas de infecções por MRSA, adquiridas na comunidade, entre os usuários de droga IV recebidos no hospital de estudo, enquanto nos pacientes em diálise e nos diabéticos é possível que esses pacientes fossem tratados com antibióticos mais frequentemente que a população geral.<sup>57</sup>

Em um estudo realizado por Onanuga & Temedie et al<sup>58</sup>, a múltipla resistência em isolados de narinas anteriores de pacientes diabéticos foi de 52,5% e, em estudo de Kutlu et al<sup>53</sup> realizado em 2012, essa prevalência foi de 40% em diabéticos ambulatoriais. A alta resistência aos antimicrobianos em MRSA isolados de pacientes diabéticos também foi verificada por Alizargar et al<sup>47</sup> em estudo realizado no Irã, com taxa de resistência à eritromicina, ciprofloxacina, claritromicina de 81,9%, 71,3% e 65,5% e taxa de multiresistência de 59%. Duas amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) foram isoladas nesse estudo<sup>47</sup>. Outro VRSA isolado de paciente diabético também foi isolado no Irã em 2012<sup>59</sup> e em 9 dos 13 isolados de VRSA relatados desde 2002 nos Estados Unidos.<sup>60,61</sup> Esses resultados evidenciam a importância de outros estudos para a pesquisa de resistência à vancomicina em *S. aureus* isolados de diabéticos.

## 2. Justificativa

Os fatores associados com maior colonização nasal e orofaríngea por *S. aureus* em pacientes diabéticos não são claros, e em todos os estudos os indivíduos diabéticos foram selecionados a partir de populações de pacientes que procuram cuidados médicos em hospitais ou ambulatorios e provavelmente tinham diabetes mais graves, mais relacionadas com complicações ou outras comorbidades que podem aumentar a colonização por *S. aureus*. Além disso, nenhum estudo estabeleceu claramente quais os fatores que podem estar associados com a colonização por *S. aureus* e MRSA em indivíduos diabéticos. Assim, esse estudo propõe uma maior investigação sobre a epidemiologia de *S. aureus* e MRSA em indivíduos diabéticos insulina-dependentes encontrados na comunidade, para determinação da prevalência nasal e oral desses microrganismos e os fatores de risco para colonização.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos gerais

- Determinar a prevalência e fatores de risco para carreamento nasal e oral de *Staphylococcus aureus* e MRSA em indivíduos diabéticos insulino-dependentes da comunidade de Botucatu, SP.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar *Staphylococcus aureus* provenientes de mucosa nasal e oral de indivíduos diabéticos insulino-dependentes.
- Determinar a suscetibilidade *in vitro* à meticilina (oxacilina) e caracterizar o cassete cromossômico estafilocóccicomec (*SCCmec*) nos isolados resistentes.
- Detectar os fatores de virulência relacionados à colonização e patogênese em pacientes diabéticos.
- Determinar o perfil de resistência de *S. aureus* a antimicrobianos.
- Determinar a relação clonal entre os isolados de *S. aureus* e MRSA.
- Identificar fatores demográficos e comportamentais associados ao carreamento de *S. aureus* e MRSA.

#### 4. Referências

1. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7687-92.
2. Chen FJ, Huang IW, Wang CH, Chen PC, Wang HY, Lai JF, Shiau, YR, Lauderdale, TL, TSAR Hospital. *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(5):1679-83.
3. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med*. 2007, 43(6):413-423.
4. David MZ, Daum, RS. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev*. 2010, 23 (3): 616 - 87.
5. Edwards AM, Massey RC, Clarke SR. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol. Oral Microbiol*. 2011, 27: 1-10.
6. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog*. 2011, 1-13.
7. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H. The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Current Infectious Disease Reports*. 2002, 4: 400–410.
8. Lowy FD, Aiello AE, Bhat M, Johnson-Lawrence VD, Lee M, Burrell E, Wright, LN, Vasquez, G, Larson, EL. *Staphylococcus aureus* Colonization and Infection in New York State Prisons. *JID*. 2007, 196:911-8.
9. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, 13 (1): 16–34.
10. Otto M. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol*. 2010, 64:143–62.
11. Foster TJ. Immune evasion by *Staphylococci*. *Nature Reviews Microbiology*. 2005, 3 (12): 948–958.
12. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures pore-forming mechanism organization of the genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2004, 68: 981–1003.
13. Xu SX, McCormick J.K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *FCIMB*. 2012, 2(52):1-11.

14. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCC*mec* in Staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;46(1):8-20.
15. Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit Rev Microbiol. 1990;17(4):251-72.
16. Szczuka E, Urbańska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Folia Microbiol (Praha) [Internet]. 2013 Jan [citado 03 nov 2018];58(1):47–52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711180>.
17. Otto M. Staphylococcal biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 322:207-28.
18. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2151-6.
19. Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn L. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;36(2):139-141.
20. Yao D, Yu F, Qin Z, Chen C, He S, Chen Z, Zhang X, Wang L. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infection (SSTIs). BMC infect. Dis. 2010, 10: 13
21. Katayama Y, Zhang HZ, Chambers HF. PBP 2a mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams. Antimicrob Agents Chemother. 2004, 48(2):453-9.
22. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. Novel SCC*mec* type XIII (9A) identified in an ST152 methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*.
23. Livermore DM. Antibiotic resistance in *Staphylococci*. Int J Antimicrob Agents. 2000;16 Suppl 1:S3-10.
24. Swenson, J.M. New tests for the detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Newsletter. 2002;24(21):159-163.
25. International Working Group on the Classification of *Staphylococcal* Cassete Chromosome Elements (IWG-SCC). [Internet]. [Acesso em 08 ago 2016]. Disponível em: <[http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html)>. 2013
26. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. Clin Microb Rev. 1997;10:505–20.

27. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009, 7 (9): 629-641.
28. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Henri A Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005, 5: 751–62.
29. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *J Infect Dis*. 2006;193: 172–9.
30. Graham PL 3rd, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med*. 2006;144: 318–25.
31. Pires FV, Cunha MLRS, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CM. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *PLoS One*. 2014;9:e92537.
32. Partida AH, Espunes TS, Martínez JB. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community. *J. Clin. Microbiol*. 2010, 48(5):1701-5.
33. Nguyen MH, Kauffman CA, Goodman RP, Squier C, Arbeit RD, Singh N, Wagener MM e Yu VL. Nasal Carriage of and Infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-Infected Patients. *Ann Intern Med*. 1999;130(3):221-5.
34. Tsao FY, Kou HW, Huang YC. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 45 among nursing home residents and staff in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:451-8.
35. Tamer A, Karabay O, Ekerbicer H. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and associated factors in type 2 diabetic patients. *Jpn. J Infect Dis*. 2006;59:10-4.
36. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW et al., IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diab Resear Clin Pract*. 2018; 138: 271-281.
37. Flor LS, Campos MR. Prevalencia de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidencias de um inquérito de base populacional. *Ver Bras Epidemiol*. 2017; 20(1): 16-29.
38. Trivedi U, Parameswaran S, Armstrong A, Burgueno-Veja D, Griswold J, Dissanaike S, Rumbaugh K.P. Prevalence of Multiple Antibiotic Resistant Infections in Diabetic versus Nondiabetic Wounds. *J Pathog*. 2014; 2014: 1-6.
39. Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26:510–3.

40. Yosipovitch G, Hodak E, Vardi P, et al. The prevalence of cutaneous manifestations in IDDM patients and their association with diabetes risk factors and microvascular complications. *Diabetes Care*. 1998; 21:506–9.
41. Tuazon CU. Skin and skin structure infections in the patient at risk: carrier state of *Staphylococcus aureus*. *Am J Med*. 1984; 76:166.
42. Walters DP, Gatling W, Mullee MA, Hill RD. The distribution and severity of diabetic foot disease: a community study with comparison to a non-diabetic group. *Diabetic Med*. 1992; 9:354–8.
43. Muller LMAJ, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman IM, Rutten GEHM. Increased risk of common infections in patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:281–8.
44. Smith JA, O'Connor JJ, Willis AT: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in diabetes mellitus. *Lancet* 1966; 2:776-7.
45. Tuazon CU, Perez A, Kishaba T, Sheagren JN: *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. *JAMA*. 1975;231:1272.
46. Chandler PT, Chandler SD: Pathogenic carrier rate in diabetes mellitus. *Am MedSci*. 1977;273:259-65.
47. Alizargar J, Sharif M, Sharif A. Risk Factors of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Diabetic Outpatients, A Prospective Cohort Study. *Int J Microbiol Res*. 2013; 4: 147-51.
48. Lipsky BA, Pecoraro RE, Chen MS, Koepsell TD: Factors affecting staphylococcal colonization among NIDDM outpatients. *Diabetes Care*. 1987;10:483-86.
49. Boyko EJ, Lipsky BA, Sandoval R, Keane EM, Monahan JS, Pecoraro RE, R.F. Hamman RF. NIDDM and prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* colonization. San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1989;12: 189-92.
50. Ahluwalia A, Sood A, Lakshmy R, Kapil A, Pandey RM. Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Med*. 2000;17: 487-8.
51. Graham PL 3rd, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med*. 2006;144: 318–25.
52. Tamer A, Karabay O, Ekerbicer H. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and associated factors in type 2 diabetic patients. *Jpn. J Infect Dis*. 2006;59:10-4.
53. Kutlu SS, Cevahir N, Akalin S, Akin F, Caylak SD, Bastemir M, Tekin K. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a diabetic outpatient population: a prospective cohort study. *Am J. Infect Control*. 2012;40: 365-8.

54. Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell LK, McDougal FC, Tenover B, King MD. 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: 159-66.
55. Duran N, Ocak S, Eskiocak AF. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among diabetic and non-diabetic haemodialysis patients. *Int.J. Clin Pract*. 2006;60: 1204-9.
56. Baykam N, Esener H, Ergonul O, Kosker PZ, Cirkin T, Celikbas A et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on hospital admission in Turkey. *Am J Infect Control*. 2009;37: 247-9.
57. Berman DS, Schaeffler S, Simberkoff MS, Rahal JJ. *Staphylococcus aureus* colonization in intravenous drug abusers, dialysis patients, and diabetics. *J Infect Dis*. 1987;155:829-31.
58. Onanuga A, Temedie TC. Nasal carriage of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* in healthy inhabitants of Amassoma in Niger delateregion of Nigeria *Afr Health Sci*. 2011;11:176-81.
59. Dezfulian A, Aslani MM, Oskoui M, Farrokh P, Azimirad M, Dabiri H, M.T. Salehian MT, Zali MR. Identification and characterization of a high vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *van A* gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15: 803-6.
60. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Reminds Clinical Laboratories and Healthcare Infection Prevention ist's of their Role in the Search and Containment of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). [Internet]. Mai 2012. [Acesso em 18 Jun 2012]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa\\_lab\\_search\\_containment.html](http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa_lab_search_containment.html).
61. Limbago BM, Kallen AJ, Zhu W, Eggers P, McDougal LK, Albrecht VS. Report of the 13th Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from the United States. *J Clin Microbiol*. 2014;52:998-1002.

## **5. Apresentação da tese**

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

### **5.1 Artigo científico I: PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA O CARREAMENTO NASAL E OROFARÍNGEO DE *Staphylococcus aureus* EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS INSULINO-DEPENDENTES.**

Artigo escrito segundo as normas do Periódico: *Scientific Reports* (Fator de impacto: 4,122).

### **5.2 Artigo científico II: DETERMINAÇÃO DO PERFIL PATOGÊNICO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA PROVENIENTES DA MUCOSA NASAL E OROFARÍNGEA DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS INSULINO-DEPENDENTES.**

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

## 5.1 Artigo I

### **PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA O CARREAMENTO NASAL E OROFARÍNGEO DE *Staphylococcus aureus* EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS INSULINO-DEPENDENTES.**

#### **Autores:**

**Nathalia Bibiana Teixeira\***. Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu; Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP -Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. Brasil.

**Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.** Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. Brasil.

**Matheus Cristovam de Souza.** Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP -Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. Brasil.

**Thais Aline Monteiro Pereira.** Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP -Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. Brasil.

**Bibiana Prada de Camargo Colenci.** Departamento de Clínica Médica – Endocrinologia, UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. Brasil.

**Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha.** Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP -Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. Brasil.

#### **\*Autor correspondente:**

Nathalia Bibiana Teixeira

Fone: +55 14 3880 0428

E-mail: [na\\_tx0402@yahoo.com.br](mailto:na_tx0402@yahoo.com.br)

## Resumo

Diabéticos insulino-dependentes são grupo de risco para infecções como as causadas por *Staphylococcus aureus*. O estudo teve como objetivos determinar a prevalência e fatores de risco de carreamento nasal e orofaríngeo de *S. aureus* e MRSA em diabéticos insulino-dependentes de Botucatu-SP, Brasil, bem como avaliar o perfil de suscetibilidade, detecção do gene *mecA*, tipagem do SCC*mec* e tipagem molecular através de PFGE e MLST a partir de *swab* nasal e orofaríngeo de 312 indivíduos. A prevalência de *S. aureus* e MRSA foi de 30,4% e 4,8%, respectivamente, com prevalência de SCC*mec* tipo IV entre os isolados, embora alguns apresentassem SCC*mec* tipo I e II. Foi possível detectar clones entre os isolados de MRSA e MSSA nessa população, além da detecção de uma importante linhagem clonal (ST398) entre os isolados resistentes e sensíveis. A idade e a doença pulmonar foram associadas negativamente ao carreamento de *S. aureus*, enquanto que úlcera de membros inferiores foi fator de risco para o carreamento de *S. aureus*. Para MRSA apenas o sexo masculino foi associado como fator de risco. Esses dados sugerem que existe alta disseminação de MRSA entre a população de diabéticos insulino-dependentes estudada, além da emergência de linhagens importantes entre esses indivíduos.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), diabetes mellitus, resistência, tipagem molecular, PFGE, MLST.

## Abstract

Individuals with insulin-dependent diabetes are a risk group for infections caused by *Staphylococcus aureus*. The objective of this study was to determine the prevalence and risk factors for nasal and oropharyngeal carriage of *S. aureus* and MRSA in insulin-dependent diabetic individuals from Botucatu, São Paulo, Brazil. Additionally, susceptibility profiling, detection of the *mecA* gene, SCC*mec* typing and molecular typing by PFGE and MLST were performed in nasal and oropharyngeal swabs of 312 subjects. The prevalence of *S. aureus* and MRSA was 30.4% and 4.8%, respectively. SCC*mec* type IV was the predominant type among isolates, although some carried SCC*mec* types I and II. MRSA and MSSA clones were detected among the isolates of this population. In addition, an important clonal lineage (ST398) was identified among resistant and susceptible isolates. Age and lung disease were negatively associated with *S. aureus* carriage, while lower-extremity ulcers were a risk factor for *S. aureus* carriage. For MRSA, only male gender was a risk factor. These data suggest widespread dissemination of MRSA in the insulin-dependent diabetic population studied, as well as the emergence of important lineages among these individuals.

**Keywords:** methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), diabetes mellitus, resistance, molecular typing, PFGE, MLST

## Introdução

O diabetes mellitus é uma doença crônica progressiva caracterizada por elevados níveis de glicose sanguínea e está entre as doenças mais prevalentes nas sociedades modernas, na maioria das vezes com tratamento inadequado ou ausente.<sup>1</sup> Estima-se que mais de 370 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras de diabetes, com mais de 5 milhões de mortes atribuídas a doença e suas complicações em 2017.<sup>2,3</sup>

Sabe-se que indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções devido ao aumento dos níveis de glicose sanguínea e a supressão da resposta imune, bem como de presença de neuropatia e redução do fluxo sanguíneo nas extremidades o que gera frequentemente feridas de cicatrização lenta aumentando o risco de amputações e morte.<sup>4,5</sup>

*S. aureus* estão entre os principais patógenos causadores de infecções em indivíduos diabéticos, sendo que as infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) estão associadas a uma maior taxa de mortalidade em comparação com infecções por *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA).<sup>2,6</sup>

Estudos sugerem que a colonização nasal por *S. aureus* e MRSA aumenta o risco de desenvolvimento de infecções, e que o uso de insulina é fator de risco para colonização por MRSA em indivíduos diabéticos<sup>7</sup>, porém pouco se sabe sobre o papel da colonização da garganta nessa população.

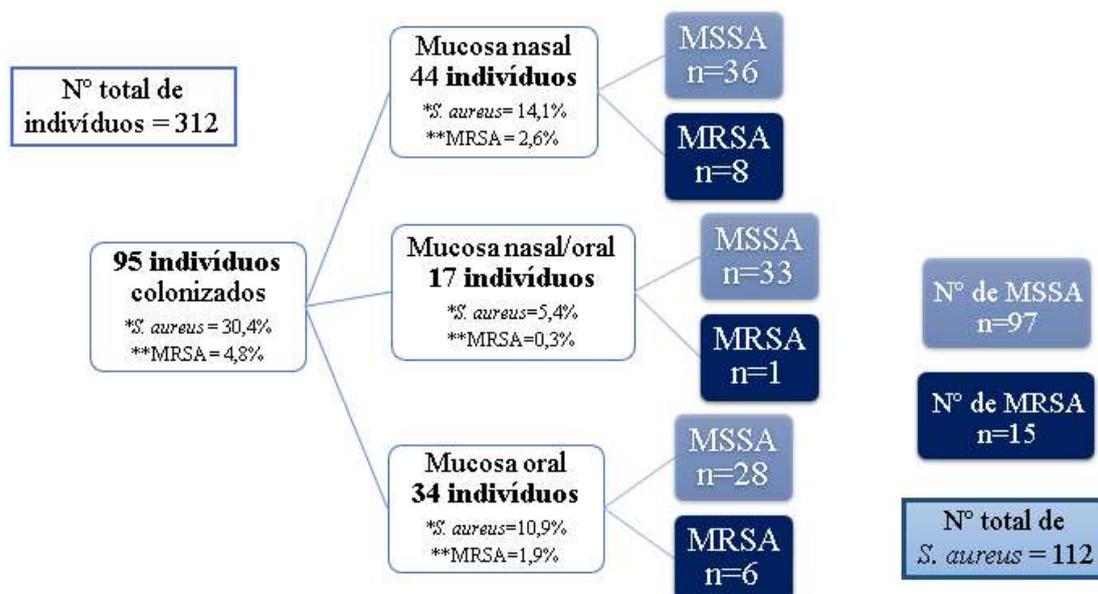
Considerando o seu impacto sobre a saúde de indivíduos diabéticos, um maior entendimento sobre epidemiologia e fatores de risco atribuídos à colonização por *S. aureus* e MRSA se faz necessária.

O objetivo do estudo foi determinar a prevalência e fatores de risco para colonização nasal e orofaríngea por *S. aureus* e MRSA em indivíduos diabéticos insulino-dependentes, bem como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados, detecção do gene *mecA*, tipagem do SCC*mec*, determinação do perfil clonal e tipagem molecular por MLST.

## Resultados

### Prevalência de carreamento de *S. aureus* e MRSA

Dos 312 indivíduos incluídos no estudo, 95 eram colonizados com *S. aureus*, sendo 15 deles colonizados com MRSA em pelo menos um dos sítios de coleta. A prevalência global de *S. aureus* foi de 30,4% (IC95% = 25,6%-35,8%) e a de MRSA foi de 4,8% (IC95% = 2,9%-7,8%). Quanto ao sítio de coleta de *S. aureus*, obteve-se isolamento exclusivamente nasal em 44 (14,1%), exclusivamente orofaríngeo em 34 (10,9%) e ambos os sítios em 17 (5,4%) indivíduos. A análise de MRSA demonstrou que dos 15 indivíduos colonizados, sete eram exclusivamente nasais e seis exclusivamente orofaríngeos. Interessante mencionar que um dos indivíduos estudados apresentou MSSA na mucosa oral e MRSA na mucosa nasal (Figura 1).



**Nota.** Fluxograma do número total de indivíduos colonizados com *S. aureus* e indivíduos colonizados com MSSA e MRSA de acordo com sítio de coleta. MSSA= methicillin-susceptible *S. aureus*. MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*. \* Prevalência global de *S. aureus*. \*\* Prevalência de MRSA.

**Figura 1.** Fluxograma do número total de indivíduos colonizados por *S. aureus* e análise do número de indivíduos colonizados por MSSA e MRSA de acordo com sítio de coleta.

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

Todos os 112 isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos aos testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* previamente descritos.

Em relação à oxacilina e cefoxitina, o método de disco-difusão revelou 11 amostras resistentes, das quais sete foram resistentes a ambas as drogas e quatro apenas a cefoxitina (halo  $\leq 21$ ). É importante salientar que quatro isolados sensíveis a ambas as drogas, apresentaram resistência pelo método genotípico.

Dentre todas as amostras, apenas uma apresentou resistência ao sulfametoxazol/trimetoprim e não foram encontrados casos de resistência à quinupristina/dalfopristina e linezolida. Além disso, o resultado encontrado para a CIM da vancomicina foi CIM 50 de 0,50  $\mu\text{g/mL}$  e CIM90 de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , com todos isolados sensíveis (Tabela 1).

**Tabela 1.** Perfil de sensibilidade dos isolados de MSSA e MRSA frente aos antimicrobianos.

<i>S. aureus</i> (112)	Gene <i>mecA</i>	Oxacilina		Cefoxitina		Linezolida		Q/D		S/T		Vancomicina CIM* ( $\mu\text{g/mL}$ )
		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	
MSSA (97)	0	0	97	0	97	0	97	0	97	1	96	0,19 - 1,5
MRSA (15)	15	7	8	11	4	0	15	0	15	0	15	0,38 - 1,5
<b>Total (112)</b>	15	7	105	11	101	0	112	0	112	1	111	0,19 - 1,5

**Nota.** Isolados identificados como MSSA e MRSA a partir da presença do gene *mecA*. R=resistente. S=sensível. Q/D=quinupristina/dalfopristina. S/T=Sulfametoxazol/trimetoprim. CIM=Concentração Inibitória Mínima. \*Faixa de variação de sensibilidade à vancomicina obtida nos isolados *mecA* negativos (MSSA) e *mecA* positivos (MRSA).

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

Dentre os 112 isolados de *S. aureus*, 15 carregavam o gene *mecA* de resistência à meticilina. Houve prevalência do SCC*mec* do tipo IV entre os isolados (10), porém também foram encontrados três isolados carregando o SCC*mec* do tipo I e dois isolados carregando o SCC*mec* do tipo II. Com exceção de dois indivíduos carregando isolados de MRSA (SCC*mec* tipo II e IV), todos relataram não ter tido acesso ao ambiente hospitalar no último ano.

### Fatores de risco para carregamento de *S. aureus* e MRSA

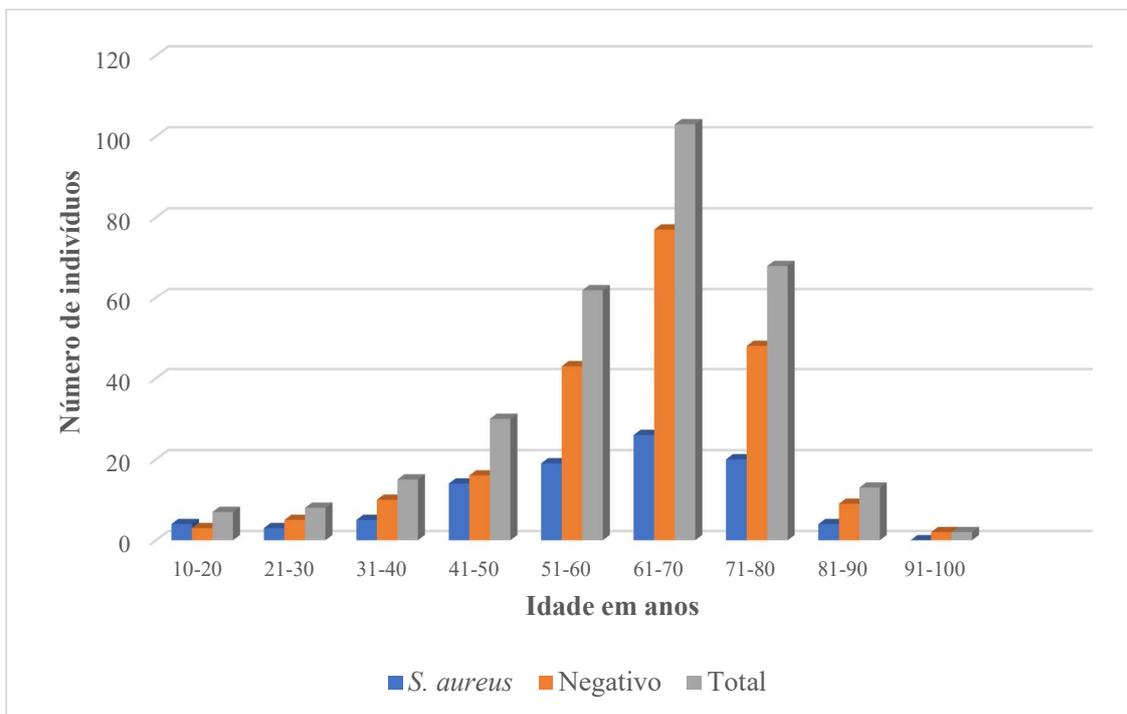
As Tabelas 2 e 3 mostram os resultados da análise univariada e multivariada (modelo de regressão logística) realizada para determinação dos fatores de risco para carregamento de *S. aureus* e MRSA.

Quanto ao estudo dos fatores de risco para carreamento de *S. aureus*, a análise univariada demonstrou associação negativa com idade (mediana 61 anos,  $p=0,04$ ), doença cardíaca ( $p=0,03$ ) e doença pulmonar ( $p=0,02$ ); e associação positiva apenas com a presença de úlcera em membros inferiores ( $p=0,02$ ). No entanto, na análise multivariada, os únicos fatores independentes associados negativamente à colonização por *S. aureus* em indivíduos diabéticos insulino-dependentes foram a idade (OR=0,98, CI95%=0,93-0,99,  $p=0,02$ ) e doença pulmonar (OR=0,31, CI95%=0,10-0,92,  $p=0,03$ ); e obteve-se associação positiva apenas com úlcera em membros inferiores (OR=2,44, CI95%=1,11-5,34,  $p=0,03$ ).

**Tabela 2.** Análise uni e multivariada (modelo de regressão logística) para preditores de carreamento de *S. aureus* em indivíduos diabéticos.

Fator	<i>S. aureus</i> 95 (%)	Negativos 217 (%)	Análise univariada		Regressão logística (multivariada)	
			OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Sexo masculino	42 (44,2)	98 (45,2)	0,96 (0,59-1,56)	0,88		
<b>Idade (mediana, quartis)</b>	<b>61 (49-70)</b>	<b>65 (56-71)</b>	-	<b>0,04</b>	<b>0,98 (0,93 - 0,99)</b>	<b>0,02</b>
Tempo de diagnóstico em anos (mediana, quartis)	14 (9 - 20)	16,5 (8 - 25)	-	0,84		
Uso de insulina em anos (mediana, quartis)	8 (4 - 14)	7 (3 - 11)	-	0,22		
Diabetes do tipo II	78 (82,1)	184 (84,8)	0,82 (0,43 - 1,56)	0,35		
<b>Doença Cardíaca</b>	<b>16 (17,4)</b>	<b>61 (29,0)</b>	<b>0,51 (0,28 - 0,95)</b>	<b>0,03</b>		
<b>Doença Pulmonar</b>	<b>4 (4,3)</b>	<b>29 (13,8)</b>	<b>0,28 (0,10 - 0,83)</b>	<b>0,02</b>	<b>0,31 (0,10 - 0,92)</b>	<b>0,03</b>
Doença Renal	23 (25,0)	59 (28,1)	0,85 (0,49 - 1,49)	0,58		
Doença Hepática	9 (9,8)	18 (8,6)	1,16 (0,50 - 2,68)	0,73		
Doença do SNC	19 (20,7)	31 (14,8)	1,50 (0,80 - 2,82)	0,20		
Neoplasias	11 (11,8)	28 (13,1)	0,89 (0,42 - 1,87)	0,75		
Trauma	8 (8,7)	23 (11,0)	0,77 (0,33 - 1,80)	0,55		
Tatuagem	4 (4,3)	12 (5,7)	0,75 (0,23 - 2,39)	0,78		
<b>Úlcera MMII</b>	<b>15 (16,3)</b>	<b>16 (7,6)</b>	<b>2,36 (1,11 - 5,01)</b>	<b>0,02</b>	<b>2,44 (1,11 - 5,34)</b>	<b>0,03</b>
Amputação	2 (2,2)	8 (3,8)	0,56 (0,18 - 2,70)	0,73		
Índice de comorbidade de Charlson $\geq 1$	3 (2 - 4)	3 (2 - 4)	-	0,84		
Internação no último ano	11 (12,0)	37 (17,6)	0,63 (0,31 - 1,31)	0,21		
Cirurgia no último ano	10 (10,9)	22 (10,5)	1,04 (0,47 - 2,30)	0,91		
Uso de antimicrobiano no último ano	21 (22,8)	57 (27,3)	0,79 (0,44 - 1,40)	0,42		

**Nota.** Todos os valores estão em número (%) exceto quando especificado. Dados com associação significativa estão em negrito. OR= Odds ratio. IC=Intervalo de confiança. SNC= Sistema Nervoso Central. MMII= membros inferiores



**Nota.** Estratificação da idade a cada 10 anos dos indivíduos incluídos no estudo.

**Figura 2.** Comparação entre a idade dos indivíduos diabéticos insulino-dependentes colonizados com *S. aureus* e não colonizados (negativo).

O estudo dos fatores de risco para carreamento de MRSA (Tabela 3) revelou associação positiva apenas para o sexo masculino nas duas análises realizadas, univariada e multivariada (OR=3,64, CI95%=1,12-11,78,  $p=0,03$ ).

**Tabela 3.** Análise uni e multivariada (modelo de regressão logística) para preditores de carreamento de MRSA em indivíduos diabéticos.

Fator	MRSA 15 (%)	Negativos 297 (%)	Análise univariada		Regressão logística (multivariada)	
			OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
<b>Sexo masculino</b>	<b>11 (73,3)</b>	<b>129 (43,3)</b>	<b>3,58 (1,11 - 11,51)</b>	<b>0,02</b>	<b>3,64 (1,12 - 11,78)</b>	<b>0,03</b>
Idade (mediana, quartis)	58 (46 - 73)	63 (54 - 71)	-	0,27		
Tempo de diagnóstico em anos (mediana, quartis)	13 (10 - 19)	15 (9 - 24)	-	0,56		
Uso de insulina em anos (mediana, quartis)	8 (3 - 15)	7 (3 - 12)	-	0,94		
Diabetes do tipo II	11 (73,3)	251 (84,5)	0,50 (0,15 - 1,65)	0,27		
Doença Cardíaca	3 (20,0)	74 (25,8)	0,72 (0,20 - 2,62)	0,77		
Doença Pulmonar	0	33 (11,5)	-	0,39		
Doença Renal	4 (26,7)	78 (27,2)	0,97 (0,30 - 3,15)	1,00		
Doença Hepática	1 (6,7)	26 (9,1)	0,72 (0,09 - 5,67)	1,00		
Doença do SNC	1 (6,7)	49 (17,1)	0,35 (0,04 - 2,70)	0,48		
Neoplasias	2 (13,3)	37 (12,7)	1,06 (0,30 - 4,87)	1,00		
Trauma	0	31 (10,8)	-	0,38		
Tatuagem	1 (6,7)	15 (5,2)	1,29 (0,16 - 10,52)	0,57		
Úlcera MMII	3 (20,0)	28 (9,8)	2,31 (0,61 - 8,69)	0,19		
Amputação	1 (6,7)	9 (3,1)	2,21 (0,26 - 18,65)	0,40		
Índice de comorbidade de Charlson $\geq 1$	3 (2 - 4)	3 (2 - 4)	-	0,41		
Internação no último ano	2 (13,3)	46 (16,0)	0,81 (0,18 - 3,69)	1,00		
Cirurgia no último ano	3 (20,0)	29 (10,1)	2,22 (0,59 - 8,34)	0,20		
Uso de antimicrobiano no último ano	4 (26,7)	74 (25,9)	1,04 (0,32 - 3,37)	1,00		

**Nota.** Todos os valores estão em número (%) exceto quando especificado. Dados com associação significativa estão em negrito. OR= Odds ratio. IC=Intervalo de confiança. SNC= Sistema Nervoso Central. MMII= membros inferiores

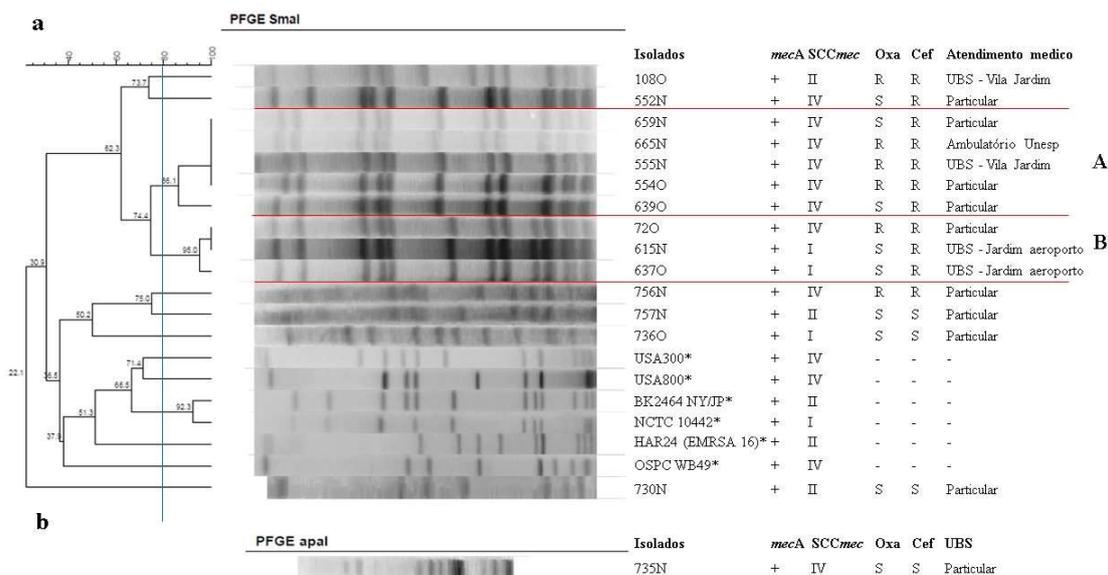
### **Determinação do perfil clonal dos isolados de *S. aureus* e MRSA por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)**

Foram analisados 112 isolados de *S. aureus* pela técnica de PFGE. Quarenta e cinco deles foram repetidamente não-tipados com a enzima *SmaI*, dentre eles, um isolado de MRSA, no entanto, foi possível obter a tipagem molecular de todos os 45 isolados utilizando a enzima *ApaI*.

Na análise do perfil clonal foi realizado um dendrograma para isolados de *S. aureus* sensíveis (MSSA) e um dendrograma para os isolados resistentes (MRSA) com

cada uma das enzimas (*SmaI* e *ApaI*), sendo possível identificar a presença de *clusters* com similaridade  $\geq 80\%$  em ambos os grupos.

A Figura 2 demonstra o dendrograma dos isolados de MRSA dos perfis PFGE-*SmaI* e PFGE-*ApaI*, com perfil de sensibilidade *in vitro* à oxacilina e cefoxitina, presença do gene *mecA* e tipagem do *SCCmec*. A análise do isolados PFGE+*SmaI* revelou a presença de dois *clusters* (A e B). O *cluster* A com 5 isolados, quatro deles apresentando 100% de similaridade (554O, 555N, 659N e 665N), sendo todos isolados de indivíduos diferentes, que fazem acompanhamento do diabetes em diferentes Unidades Básicas de Saúde (UBS) ou atendimento em consultório médico particular, e todos carregando o *SCCmec* tipo IV. Também foi possível verificar um *cluster* (B) de 3 amostras, onde duas delas tiveram 100% de similaridade (72O e 615N). O isolado de MRSA tipado com a enzima *ApaI* está demonstrado na Figura 2 (b). Nenhum dos isolados agrupou com os clones internacionais usados como controle.



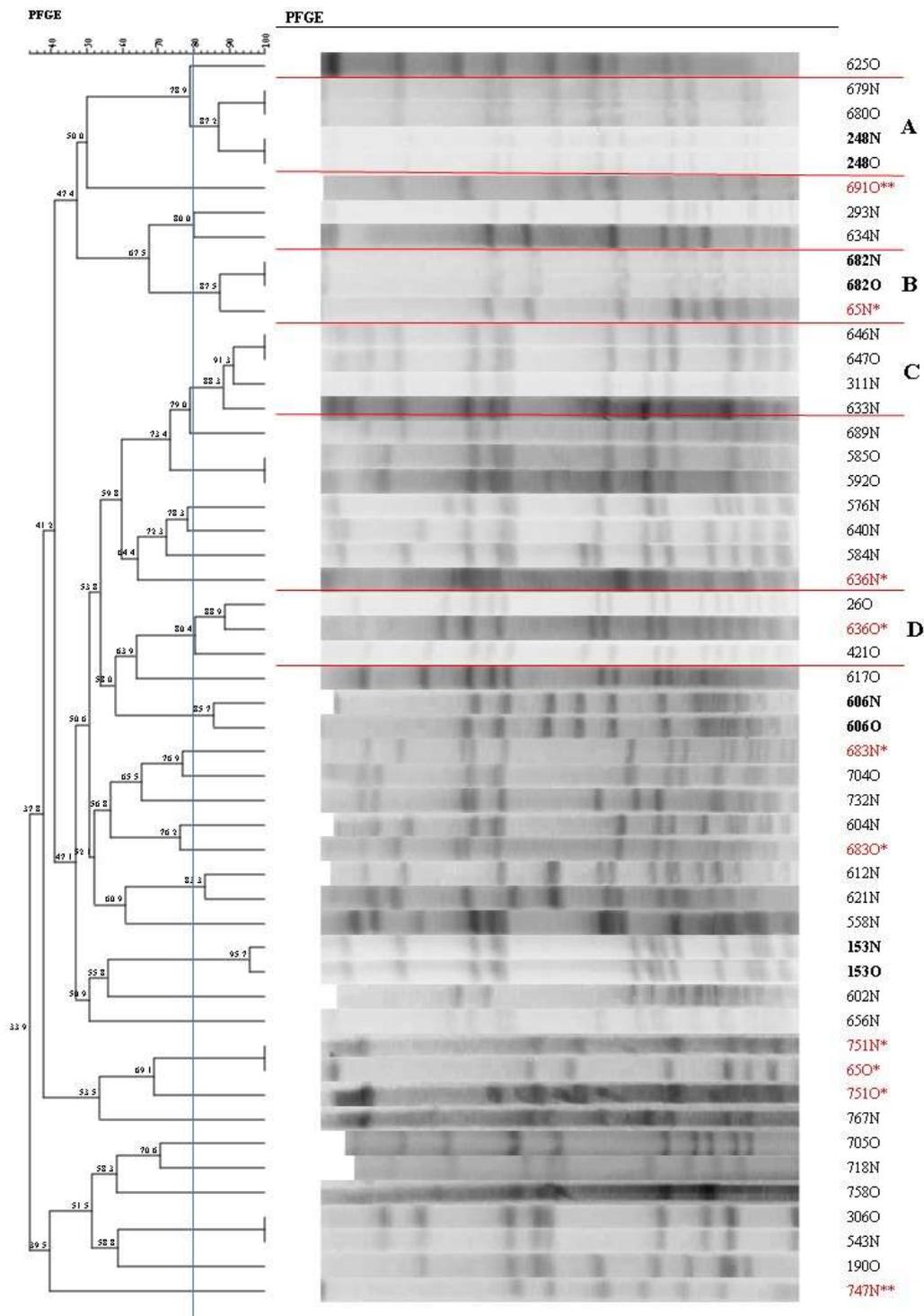
**Nota. a.** Isolados que agruparam com  $> 80\%$  de similaridade (*clusters* A e B) através da digestão com a enzima de restrição *SmaI*. **b.** Padrão de bandas da amostra 735N digerida com a enzima de restrição *ApaI*. N=mucosa nasal. O=mucosa orofaríngea. \* Clones internacionais usados como controle. S= sensível. R=resistente. Atendimento médico = serviços de atenção primária de acompanhamento do diabetes. UBS= Unidades Básicas de Saúde.

**Figura 3.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,2% (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*SmaI* e PFGE-*ApaI* de isolados de MRSA provenientes de indivíduos diabéticos insulino-dependentes.

Em relação aos isolados MSSA, obteve-se dois *clusters* (A e C) de quatro amostras e dois *clusters* (B e D) de três amostras (Figura 3). No *cluster* A, observa-se a presença de dois isolados provenientes da mucosa nasal e orofaríngea do mesmo indivíduo, evidenciando o fato de o indivíduo ser colonizado em sítios diferentes pelo mesmo isolado. Da mesma forma, no *cluster* B nota-se dois isolados provenientes da mucosa nasal e orofaríngea do mesmo indivíduo agrupando com um isolado nasal de outro. Já no *cluster* C, os quatro isolados são provenientes de indivíduos sem relação entre si e no *cluster* D, nota-se que todos os isolados são provenientes da mucosa orofaríngea de indivíduos diferentes. Esses achados sugerem que pode haver alta disseminação de *S. aureus* na comunidade.

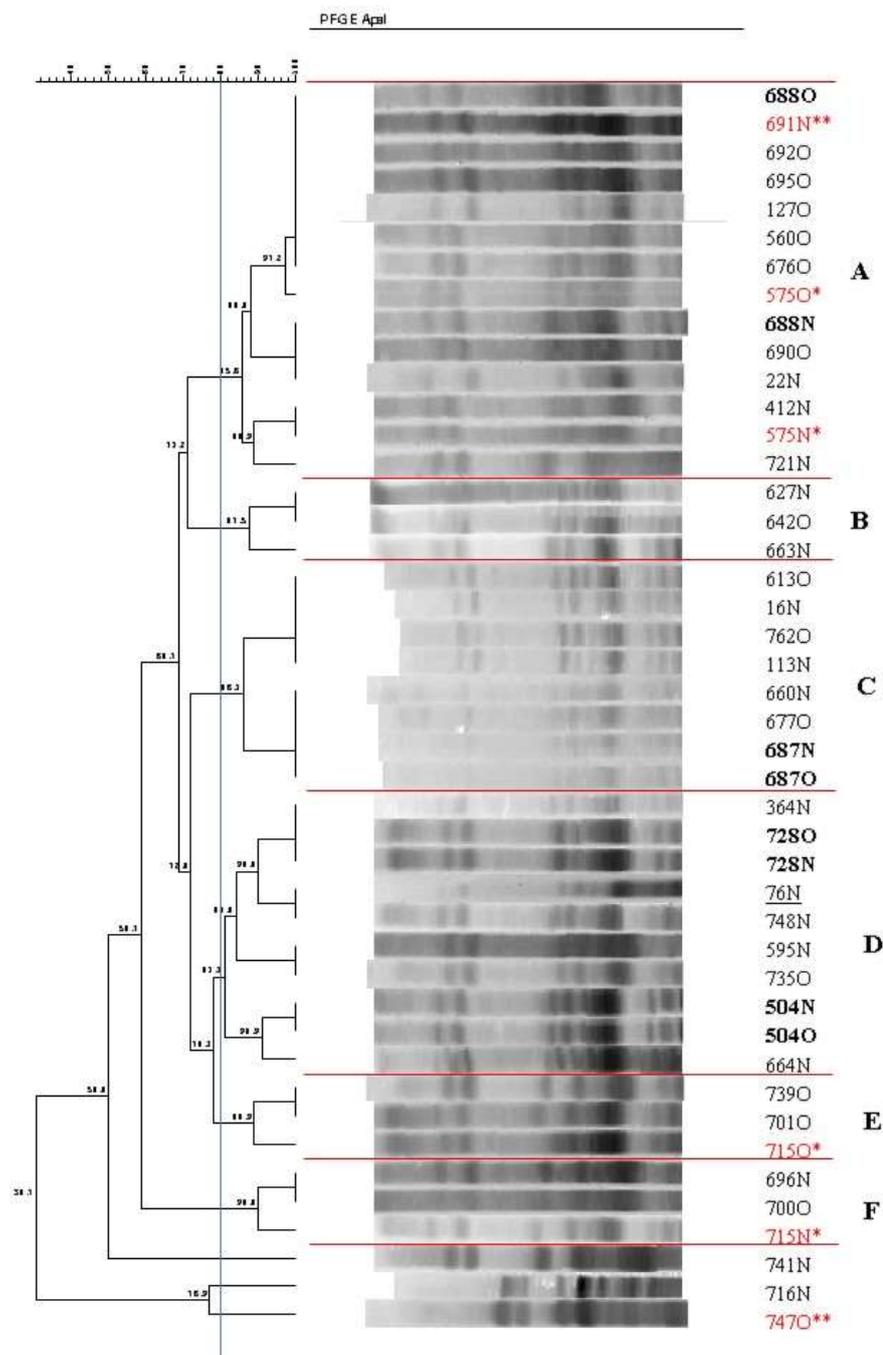
Interessante notar que dos 17 indivíduos colonizados em ambos os sítios de coleta (nasal/orofaríngea), 26,7% (4) estavam colonizados com o mesmo isolado na mucosa nasal e orofaríngea, porém 33,4% (5) tinham cepas diferentes de *S. aureus* no nariz e na garganta. Destaca-se ainda que dois pacientes colonizados concomitantemente com *S. aureus* no nariz e garganta tiveram suas cepas tipadas após digestão com enzimas de restrição diferentes, 691O e 747N foram tipadas após digestão com a enzima de restrição *SmaI*, enquanto 691N e 747O somente foram tipadas após digestão com a enzima *Apal*, confirmando serem cepas de *S. aureus* distintas.

Quanto à análise dos isolados tipáveis pela enzima de restrição *Apal*, obteve-se três *clusters* majoritários (A, C e D) e três *clusters* menores de 3 isolados (B, E e F). No *cluster* A, com 14 isolados agrupados com 85,6% de similaridade, notou-se a presença de dois isolados provenientes da mucosa nasal e orofaríngea do mesmo indivíduo e o restante proveniente de indivíduos diferentes. O mesmo foi observado no *cluster* C e D, sendo que no *cluster* D, os isolados agruparam com uma amostra previamente identificada em outro estudo como ST398 (amostra 76N). Esses achados estão demonstrados na Figura 4.



**Nota.** Isolados em negrito são provenientes do mesmo indivíduo e apresentam o mesmo perfil em ambos os sítios de coleta (nasal/orofaríngeo). \*Isolados provenientes do mesmo indivíduo, porém, apresentando perfis distintos. \*\* Os isolados identificados como 691N e 747O obtidos dos mesmos indivíduos dos isolados 691O e 747N, respectivamente, não foram tipados após digestão com a enzima *SmaI*. N= mucosa nasal. O= mucosa orofaríngea.

**Figura 4.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,2% (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*SmaI* de isolados de MSSA provenientes de indivíduos diabéticos insulino-dependentes.

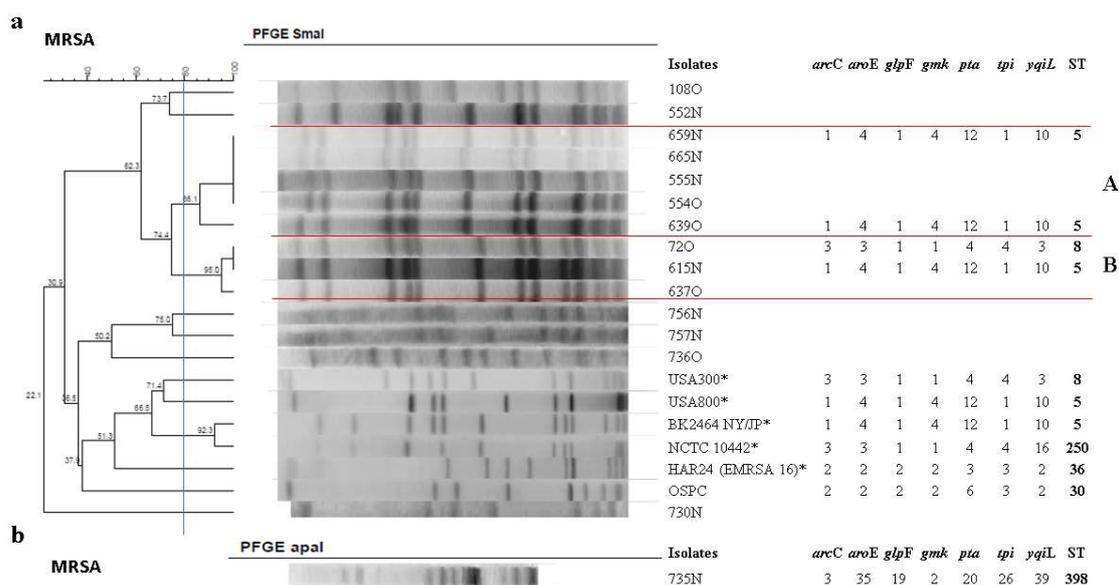


**Nota.** Isolados em negrito são provenientes do mesmo indivíduo e apresentam o mesmo perfil em ambos os sítios de coleta (nasal/orofaríngeo). \* Isolados provenientes do mesmo indivíduo, porém, apresentando perfis distintos. \*\* Os isolados identificados como 691O e 747N obtidos dos mesmos indivíduos dos isolados 691N e 747O, respectivamente, foram tipados com a enzima *SmaI*. Amostra 76N previamente isolada e identificada como *S. aureus* ST398 de paciente da mesma cidade e isolada em outro estudo, encontra-se grifada no dendrograma. N= mucosa nasal. O= mucosa orofaríngea.

**Figura 5.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,2% (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*ApaI* de isolados de MSSA provenientes de indivíduos diabéticos insulino-dependentes.

## Tipagem molecular de *S. aureus* e MRSA pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

A partir dos *clusters* formados pela técnica de PFGE foram selecionadas nove amostras de *S. aureus* (quatro MSSA e cinco MRSA) para a tipagem molecular pela técnica de MLST. Quanto a análise por MLST dos isolados de MRSA, obteve-se uma prevalência do *sequence types* ST 5 em três dos quatro isolados analisados e um ST 8. Além desses, também foi identificado um isolado caracterizado como ST 398 na amostra tipada com *Apal* no PFGE (Figura 5).

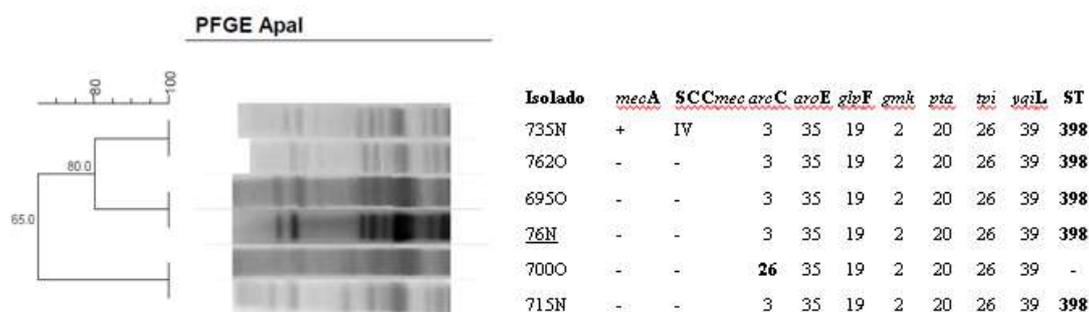


**Nota.a.** Isolados resistentes que agruparam com > 80% de similaridade (*clusters* A e B) através da digestão com a enzima de restrição *SmaI* (I). **b.** Padrão de bandas da amostra 735N tipável com a enzima de restrição *Apal*. N=mucosa nasal. O=mucosa orofaríngea. \* Clones internacionais usados como controle. *arcC*= gene carbamato quinase. *aroE*=gene desidrogenase do chiquimato. *glpF*=glicerol quinase. *gmk*=guanilato quinase. *pta*=fosfato acetiltransferase. *tpi*=triose-fosfato isomerase. *yqiL*=acetil coenzima A. ST= *sequence types*.

**Figura 6.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,2% (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*SmaI* e PFGE-*Apal* de isolados de MRSA e os *sequence types* (ST) obtidos pela técnica de MLST.

A partir dos *clusters* formados pela técnica de PFGE dos MSSA não-tipáveis com a enzima de restrição *SmaI* e digeridos com a enzima de restrição *Apal* foram selecionadas quatro linhagens para a tipagem por MLST. Dentre eles, foi possível

observar uma prevalência de ST 398 (3) entre os isolados, porém uma amostra apresentou divergência no alelo do gene *arcC* e ainda não foi possível a obtenção do seu *sequence type* (ST), pois será enviada para o curador do banco de dados do MLST (<http://www.mlst.net>) para identificação de novo ST (Figura 6).



**Nota.** Agrupamento dos isolados digeridos com a enzima *Apal* e que foram analisados pela técnica de MLST. Todos, com exceção do isolado 735N, foram sensíveis à meticilina (MSSA). N=mucosa nasal. O=mucosa orofaríngea. *arcC*= gene carbamato quinase. *aroE*=gene desidrogenase do chiquimato. *glpF*=glicerol quinase. *gmk*=guanilato quinase. *pta*=fosfato acetiltransferase. *tpi*=triose-fosfato isomerase. *yqiL*=acetil coenzima A. ST= *sequence types*. A amostra 76N foi identificada como ST398 em estudo prévio realizado no mesmo laboratório.

**Figura 7.** Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA, Otimização: 1% e Tolerância: 1,2% (*Bionumerics Applied Maths*) dos perfis PFGE-*Apal* de isolados de *S. aureus* e MRSA e os *sequence types* (ST) obtidos pela técnica de MLST.

## Discussão

Atualmente a resistência bacteriana encontra-se em posição de destaque como uma grande ameaça global. Sabe-se que *Staphylococcus aureus* tem grande evidência nesse cenário por ser capaz de causar infecções que variam desde superficiais até infecções sistêmicas graves, potencialmente fatais, além da facilidade em adquirir resistência às múltiplas drogas. Antigamente, o patógeno apresentava-se concentrado em ambientes hospitalares, porém hoje nota-se um aumento, principalmente de isolados resistentes (MRSA) de origem comunitária que são geneticamente distintos das cepas hospitalares tradicionais<sup>8,9,10</sup>.

Estudos sugerem que infecções estafilocócicas sejam precedidas pelo processo de colonização<sup>2,11-15</sup> e que pelo menos um terço dos adultos hígidos colonizados apresentam risco de desenvolver infecções invasivas subsequentes.<sup>8,9</sup>

Indivíduos diabéticos são considerados grupos de risco para infecções de pele como as causadas por *S. aureus*, além de serem mais propensos a desenvolver infecções sistêmicas graves<sup>15</sup>. Estudos tem demonstrado que a prevalência de colonização nasal de *S. aureus* (27%-56,6%) e MRSA (1%-7,3%) varia de acordo com a localização geográfica e que o uso de insulina é fator de risco para o carregamento nasal de MRSA em diabéticos<sup>7</sup>.

A prevalência de colonização por *S. aureus* em indivíduos diabéticos insulino-dependentes foi de 30,4% e de MRSA foi 4,8%. Nossos resultados diferem dos encontrados por Kutlu et al.<sup>16</sup>, que analisaram 304 indivíduos e encontraram uma prevalência de 41,9% de *S. aureus* e 9,9% de MRSA entre os diabéticos. Alizargar et al.<sup>7</sup>, também obtiveram uma prevalência maior de *S. aureus* (42,5%) e MRSA (24,7%). A prevalência menor encontrada nesse estudo em comparação aos estudos internacionais pode ser devido ao viés de coletas em pacientes diabéticos atendidos em hospitais. Em nosso estudo as coletas foram realizadas em pacientes atendidos fora do hospital, em Unidades Básicas de Saúde (UBS) ou atendimento particular. Em inquérito de base populacional realizado no mesmo município, Pires et al<sup>17</sup> estudando indivíduos da comunidade encontraram resultado similar, com prevalência global de 32,7% de *S. aureus*, porém para MRSA, nossos achados foram superiores (4,6% vs 0,9%).

Em estudo recente conduzidos por Lin et al.<sup>2</sup> foi encontrada prevalência de *S. aureus* e MRSA menor que a do presente estudo (16,4% e 2,8%, respectivamente). Os autores sugerem que a presença de diferentes microrganismos na microbiota desses indivíduos gera uma competição pelo mesmo sítio, podendo explicar a variação encontrada em estudos de prevalência. Nenhum dos estudos incluíram a mucosa oral como potencial sitio de colonização.

É importante ressaltar que 10,9% (34) dos indivíduos foram colonizados exclusivamente na mucosa oral, seis dos quais eram colonizados por MRSA. Esse fato reforça os achados de Partida et al.<sup>18</sup>, de que indivíduos colonizados na mucosa oral podem prejudicar medidas de controle de disseminação de patógenos, uma vez que a garganta não entra na triagem de rotina.

Os isolados de MRSA foram identificados por métodos fenotípicos por meio da técnica de disco difusão e através da técnica de PCR para a detecção do gene *mecA* considerada padrão ouro para detecção de isolados resistentes à metilicina. Segundo

recomendações do CLSI<sup>19</sup>, o disco de cefoxitina tem sido utilizado para detecção de resistência à meticilina por apresentar maior sensibilidade para identificação de isolados carreadores do gene *mecA*<sup>19</sup>. Os resultados do presente estudo confirmam a maior sensibilidade do disco de cefoxitina frente à oxacilina, uma vez que apenas sete dos 15 isolados apresentaram resistência ao disco de oxacilina, enquanto 11 foram resistentes à cefoxitina. Porém foram encontrados quatro isolados que carregavam o gene *mecA* e não apresentavam resistência fenotípica à cefoxitina e oxacilina.

O agente mais comum isolado de infecções em indivíduos diabéticos é o *S. aureus* com alta prevalência de MRSA<sup>20</sup>. Em estudo recente, Chaudhry et al<sup>6</sup>, trabalhando com isolados clínicos observaram que dentre *S. aureus*, 84% eram MRSA e 20% eram resistentes à vancomicina. Em nosso estudo, encontramos menor prevalência de MRSA e nenhum isolado apresentou resistência à vancomicina, embora um dos isolados de MRSA tenha apresentado CIM de 1,5µg/mL, apresentando potencial risco terapêutico<sup>21-23</sup>. Outros dois isolados de MSSA apresentaram CIM de 1,5 µg/mL para vancomicina.

Em nosso estudo, a análise dos fatores de risco revelou associação positiva apenas com úlcera de membros inferiores o que é consistente como vários achados da literatura, onde o mesmo isolado colonizando as narinas foi encontrado em úlceras e feridas do pé<sup>24,25</sup>.

A idade apresentou associação negativa para colonização com *S. aureus*, com *odds ratio* de 0,98, indicando uma diminuição de 2% no risco de colonização por *S. aureus* a cada ano adicional na idade. Dados similares foram encontrados por Pereira-Franchi et al.<sup>26</sup> Doença pulmonar também apresentou associação negativa para colonização por *S. aureus*, fato que pode estar associado à colonização do trato respiratório por outros microrganismos que podem estar competindo com *S. aureus*. Mueller et al<sup>27</sup>, também encontraram associação negativa com a idade, porém diferente dos nossos achados, encontraram que doença pulmonar era fator de risco para colonização por *S. aureus*.

A análise multivariada revelou que o sexo masculino é fator de risco para colonização por MRSA. Esses dados contrastam com os dados encontrados por Pereira-Franchi et al.<sup>26</sup> onde nenhuma associação de fator de risco para colonização com MRSA foi observada.

Quanto a clonalidade dos isolados, foi possível notar um clone de MRSA importante nos indivíduos diabéticos insulino-dependentes da comunidade estudada. Dos 15 indivíduos diabéticos com MRSA, cinco apresentaram isolados pertencentes ao mesmo *cluster* (A), todos apresentando o SCC*mec* do tipo IV. Importante ressaltar que os isolados 639O e 659N presentes nesse cluster possuem o ST5 demonstrando sua possível origem comum. Houve ainda um *cluster* menor (B) com três isolados também de três indivíduos diferentes, sendo 1 de origem nasal (615N-ST5-SCC*mec* I) e 2 de origem oral, sendo que um deles (72O) apresentou o ST8 e a presença do SCC*mec* do tipo IV. Esse fato volta a reforçar a importância da colonização da garganta, uma vez que essa pode ser uma via de transmissão entre a população do estudo. Outros estudos realizados com indivíduos da mesma cidade e região também encontraram isolados de MRSA ST5-SCC*mec* Tipo IV e ST8-SCC*mec* Tipo IV, sugerindo que essas linhagens são prevalentes na região<sup>17, 29, 30, 31, 32, 33, 34</sup>.

Estudos sugerem que a diversidade clonal entre isolados de *S. aureus* é muito frequente, principalmente em se tratando de isolados sensíveis à meticilina (MSSA).<sup>28</sup> Em nosso estudo entre os isolados de MSSA houve a formação de apenas quatro *clusters*, porém vários isolados agrupando entre si, sendo possível identificar cinco indivíduos com *S. aureus* diferentes no nariz e na garganta.

Foi possível observar um elevado número de isolados demonstrando similaridade com a linhagem clonal ST398. Isolados pertencentes a essas linhagens não são digeridas pela enzima *SmaI*, resultado de um sistema de restrição/metilação do DNA ainda desconhecido no gênero *Staphylococcus* spp. No entanto, é possível digerir essas amostras utilizando a enzima *Apal*<sup>35,36</sup>. Foi possível identificar quarenta e cinco isolados não tipáveis pela técnica de PFGE convencional (restrição com *SmaI*) que agruparam após a digestão com a enzima de restrição *Apal* em 3 clusters majoritários e 4 clusters com menor número de amostras. Entre os 45 isolados, quatro foram tipados pela técnica de MLST como ST398. Esse fato também foi observado por Souza et al.<sup>33</sup>

A linhagem ST398 tem sido relacionada à infecção e colonização em seres humanos e animais de companhia, como cão, cavalo e suínos em muitos países ao redor do mundo<sup>10</sup> sendo denominada *livestock-associated S. aureus*. ST398 foi descrito pela primeira vez tanto em MSSA quanto MRSA em criadores de suínos na França<sup>35,36</sup>

desde então, essa linhagem se disseminou rapidamente para outros animais e tem sido cada vez mais relacionada a infecções não só em trabalhadores rurais como em pessoas e animais sem fatores de risco<sup>19, 37</sup>. Essa linhagem de *S. aureus* mesmo sensível à oxacilina está associada com infecções graves, conforme relatado por Bonesso et al. (2016)<sup>38</sup> em estudo com pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica, em que a maioria evoluiu para óbito.

Nossos achados evidenciam prevalência de SCCmec do Tipo IV entre os isolados, o que condiz com os achados de outros estudos de prevalência em indivíduos não diabéticos do Estado de São Paulo<sup>29, 33</sup>, porém também foram encontrados os SCCmec do tipo I e II, que são comumente encontrados em circulação no interior de serviços de saúde. A presença de SCCmec do tipo II também foi relatada por Pereira-Franchi et al<sup>26</sup>.

O presente trabalho traz dados importantes acerca da epidemiologia de *Staphylococcus aureus* e MRSA na população de diabéticos insulino-dependentes. A prevalência encontrada é menor do que a relatada na literatura internacional, provavelmente por se tratar de indivíduos advindos da comunidade, que na sua maioria não tinham acesso frequente ao hospital e no geral, apresentavam boa saúde, apesar de serem indivíduos que frequentemente procuram a atenção primária para controle do diabetes. Para a população estudada há uma maior prevalência de colonização por MRSA e é de extrema importância a triagem da colonização da garganta, visto que foram encontrados indivíduos colonizados apenas nesse sítio.

Os isolados analisados apresentavam baixa taxa de resistência às drogas testadas visto que somente uma foi resistente ao sulfametoxazol-trimetoprim, porém a prevalência de MRSA foi maior que a encontrada em estudo de base populacional realizado no mesmo município com indivíduos saudáveis<sup>16</sup>. Foi possível detectar clones entre os isolados de MSSA e MRSA nessa população, além da detecção de uma importante linhagem clonal (ST398) entre os isolados. Esses dados sugerem que existe alta disseminação de MRSA entre a população de diabéticos insulino-dependentes estudada, além da emergência de linhagens importantes de *S. aureus* entre esses indivíduos.

As limitações do estudo foram o baixo número de MRSA encontrado, o que pode dificultar a análise estatística dos fatores de risco para carreamento de MRSA e o

fato de os indivíduos não serem totalmente comunitários, pois necessitam fazer o controle do diabetes em serviços de atenção primária.

## **Materiais e métodos**

### **Delineamento do estudo**

O estudo foi realizado por meio de um delineamento transversal no município de Botucatu-SP-Brasil, que, atualmente conta com uma população estimada de 144.820 indivíduos.<sup>39</sup>

O cálculo amostral foi efetuado com base no número de diabéticos insulino-dependentes cadastrados na secretaria da saúde do município para recebimento de aparelhos glicosímetro, totalizando 1631 indivíduos. Utilizando o cálculo para proporções, obteve-se um “n” sugerido de 312 indivíduos. A fórmula utilizada para o cálculo amostral está disposta no Anexo I.

Os indivíduos foram selecionados aleatoriamente do banco de dados da secretária da saúde. Quando possível, os mesmos foram recrutados em visitas domiciliares, porém muitas coletas foram realizadas por meio de eventos promovidos nas Unidades Básicas de Saúde, consultório médico e na sede da Associação Botucatuense de Apoio ao Diabético (ABAD). A caracterização da população incluída no estudo pode ser visualizada no anexo II. Aos que aceitaram participar, foi aplicado questionário (Anexo III), incluindo dados demográficos (gênero e idade), tipo de diabetes (I ou II), tempo de diagnóstico (anos), tempo de uso de insulina (anos), dados clínicos (comorbidades), presença de úlceras ou amputações, tatuagem, internações ou procedimentos médicos no último ano; quadros infecciosos e uso de antimicrobianos no último ano. Importante ressaltar que todas as informações foram obtidas por meio de entrevista com o próprio paciente e/ou responsável, e que foram observados os parâmetros éticos de pesquisa mediante a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo IV).

## Coleta dos espécimes microbiológicos

Foram coletadas amostras das mucosas nasal e orofaríngea de 312 indivíduos diabéticos insulino-dependentes residentes no município de Botucatu, SP, Brasil, no período de outubro de 2015 a julho de 2018 por meio de *swabs* estéreis com meio de transporte. Os espécimes foram obtidos das narinas anteriores e orofaringe, utilizando um *swab* para cada sítio.

A técnica de coleta nasal consistiu na umidificação do *swab* com solução fisiológica 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas às narinas e rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. O procedimento para coleta de orofaringe consistiu na umidificação do *swab*, comprimindo o mesmo de forma suave sobre toda superfície da garganta, evitando o contato do coletor com a língua.

Os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, para realização de semeadura em placas contendo ágar Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 48 horas as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos microrganismos isolados.

## Identificação de *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos foram submetidos à coloração de Gram objetivando-se a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram realizadas as provas de catalase e coagulase em tubo e as provas bioquímicas maltose, trealose e manitol para diferenciação de *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.<sup>40,41</sup>

Após a extração do DNA com Kit Illustra (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), a confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada por meio da detecção do gene que codifica o RNAr16S<sup>42</sup> e o fragmento de DNA SA442 específico de *S. aureus*<sup>43</sup>.

## Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado para todos os isolados obtidos por meio da técnica de disco difusão a partir de discos impregnados conforme

critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>19</sup>. As drogas utilizadas foram: Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Linezolida (30µg), Quinupristina/Dalfopristina (15µg), Sulfametoxazol/Trimetoprim (25 µg). A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI.<sup>19</sup>

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

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

Os resultados da CIM foram denominados sensível, intermediário ou resistente de acordo com as definições pré-estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).<sup>19</sup>

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

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al.<sup>44</sup> Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

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

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se o método de reação de PCR Multiplex, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>45</sup> e atualizado por Milheiriço et al.<sup>46</sup>

Como controle para a tipagem do SCC*mec* foram utilizadas as cepas COL para SCC*mec* tipo I; N315 para SCC*mec* tipo IA; PER34 para o SCC*mec* tipo II; AN546 para o SCC*mec* tipo III; HU25 para o SCC*mec* tipo IIIA e MW2 para o SCC*mec* tipo IV.

### **Visualização dos produtos amplificados**

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose 2% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5M. Como padrão foi

utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. O DNA foi corado com Sybr® safe e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta.

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

Todos os isolados de *S. aureus* que foram tipados por meio do *Pulsed-Field Gel Eletroforesis* (PFGE) seguiram o protocolo modificado de McDougal et al.<sup>47</sup>

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

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

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

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,2% e 1% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice  $\geq 80\%$  foi escolhido para determinação dos *clusters*.

Quarenta e cinco isolados, dos quais um era MRSA, não puderam ser tipados utilizando a enzima *SmaI* e, portanto, foram digeridos com a enzima de restrição *ApaI*.

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

O MLST foi realizado segundo protocolo descrito por Enright et al.<sup>48</sup> através da amplificação e sequenciamento dos sete *housekeeping genes* *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*. A purificação foi realizada pelo *Kit HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction* e a reação de sequenciamento é descrita a seguir. A análise e comparação das sequências foram realizadas por banco de dados via internet (<http://www.mlst.net>) (2004). As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador ABI3500 de 8 capilares (de 50cm) usando como polímero o POP7 (*Applied Biosystems*). A visualização das sequências (eletroforograma) foi realizada pelo programa *BioNumerics* (versão 7.6; Applied Maths, Bélgica).

### **Análise estatística**

Para análise univariada foi utilizado o software EPI-INFO para Windows, versão 7.2.6 (© Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Para comparação entre variáveis dicotômicas, foram utilizados testes não paramétricos de proporção,  $X^2$  e Teste Exato de Fisher. Variáveis numéricas foram comparadas usando o teste U de Mann-Whitney.

A análise multivariada foi realizada com software SPSS versão 20.0 (© SPSS, inc.) utilizando modelo de regressão logística. Desfechos de interesse foram a presença global de *S. aureus* ou a presença de MRSA independente do sitio de coleta. Para seleção de variáveis dos modelos foram utilizadas estratégias por recuos (*stepwise backwards*). Os critérios para entrada e permanência das variáveis nos modelos foi  $p < 0,1$ . O critério final para significância estatística foi  $p < 0,05$ .

### **Questões éticas**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Brasil (nº do parecer: 1.107.685). O parecer pode ser visualizado no Anexo V.

## Referências

1. WHO guideline: Global report on diabetes. Geneva: WHO.88 p (2016).
2. Lin, S.Y., Lin, N.Y., Huang, Y.Y., Hsieh, C.C., Huang, Y.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection among patients with diabetic foot ulcer. *J. Microbiol Immun Inf.*xx,1-8 (2018).
3. Cho, N.H., et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diab Resear Clin Prat.***138**, 271-281 (2018).
4. Trivedi, U., et al. Prevalence of Multiple Antibiotic Resistant Infections in Diabetic versus Nondiabetic Wounds. *J Pathog.***2014**, 1-6 (2014).
5. Enoch, S., et al. Randomized clinical trial and economic analysis of four-layer compression bandaging for venous ulcers. *Brit J of Surg.* **90** (7), 794–798 (2003).
6. Chaudhry, W.N., et al. Clinico-microbiological study and antibiotic resistance profile of *mecA* and ESBL gene prevalence in patients with diabetic foot infections. *Experim and Therap Med.***11**, 1031-1038 (2016).
7. Alizargar, J., Sharif, M., Sharif, A. Risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in diabetic outpatients. A prospective cohort study. *Int J Microbiol Res.***4**, 147-151 (2013).
8. Hewagama, S., et al. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and Pantone-Valentine Leucocidin (*pvl*) in Central Australia, 2006-2010. *BMC Infect Dis.* Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1698-5> (2016).
9. Park, S.Y., et al. Sequence type 72 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged as a predominant clone of nasal colonization in newly admitted patients. *J Hosp Infect.* **93**,386–389 (2016).
10. Camoez, M., et al. Prevalence and Molecular Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. *Plos One.* **8**(9), 1-6 (2013).
11. Kalmeijer, M.D., et al. Surgical site infections in orthopedic surgery: the effect of mupirocin nasal ointment in a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Clin Infect Dis.***35**,353-358 (2002).

12. Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., Peters, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study group. N Engl J Med.**344**,11-16 (2001).
13. Stanaway, S., Johnson, D., Moulik, P., Gill, G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation from diabetic foot ulcers correlates with nasal MRSA carriage. Diabetes Res Clin Pract.**75**, 47-50 (2007).
14. Haleem, A., et al. Concordance of nasal and diabetic foot ulcer staphylococcal colonization. Diagn Microbiol Infect Dis.**79**, 85-89 (2014).
15. Shah, B.R., Hux, J.E. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. Diabetes Care.**26**, 510–513 (2003).
16. Kutlu, S.S., et al. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a diabetic outpatient population: a prospective cohort study. Am J. Infect Control.**40**, 365-368 (2012).
17. Pires, F.V., Cunha, M.L.R.S., Abraão, L.M., Martins, P.Y., Camargo, C.H., Fortaleza, C.M.C.B. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. PLoS One.**9**, 925-37 (2014).
18. Partida, A.H., Espunes, T.S., Martínez, J.B. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. J. Clin. Microbiol.**48**(5),1701-1705 (2010).
19. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— 26th Edition (M100S). CLSI, 2016.
20. Vandendriessche, S., et al. Previous healthcare exposure is the main antecedent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on hospital admission in Belgium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**22**83–2292 (2012).
21. Soriano, A., et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis.**46**,193-200 (2008).
22. Howden, B.P., et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. Clin Infect Dis.**38**, 521-528 (2004).

23. Yeg, Y.C., et al. Impact of vancomycin MIC creep on patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Microbiol Immunol Inf.* **45**, 214-220 (2012).
24. Richard, J.L., Sotto, A., Lavigne, J.P. New insights in diabetic foot infection. *World J Diabetes.* **2**, 24-32 (2011).
25. Taha, A.B. Relationship and susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* infection diabetic foot ulcers with *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Foot (Edinb).* **23**, 11-6 (2013).
26. Pereira-Franchi, E.P., Barreira, M.R.N., da Costa, N.S.L.M., Fortaleza, C.M.C.B., Cunha, M.L.R.S. Prevalence of and risk factor associated with the presence of *Staphylococcus aureus* in the chronic wounds of patients treated in primary health care settings in Brazil. *Ver Soc Bras Med Trop.* **50**(6), 833-838 (2017).
27. Muller, L.M.A.J, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis.* **41**, 281-288 (2005).
28. Robinson, D.A., Enright, M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chem.* **47**(12), 3926-3934 (2003).
29. Silveira, M. Prevalência e fatores de risco para carreamento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em idosos institucionalizados na cidade de Bauru-SP. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2013.
30. Witzel, C.L., Fortaleza, C.M., de Souza, C.S., Riboli, D.F., Cunha, M.L.R.S. Nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* among imprisoned males from Brazil without exposure to healthcare: risk factors and molecular characterization. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **13**, 1-6 (2014).
31. Lastoria, L.C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em pessoas vivendo com HIV/AIDS acompanhadas em um serviço ambulatorial de referência em Botucatu (SP): prevalência, resistência à metilina e epidemiologia molecular. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2016.
32. Abraão, L.M. Carreamento nasal/oral de *Staphylococcus aureus* em populações indígenas do norte e sudeste do Brasil: resistência antimicrobiana, virulência, fatores de risco e epidemiologia

- molecular. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2017.
33. Souza, C.S.M. Determinação da relação clonal e virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes vivendo com HIV/AIDS e seus familiares. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2018.
  34. Pereira-Franchi, et al. Molecular epidemiology of MRSA in the Brazilian primary health care system. *Trop Med & Intern Heal*. doi:10.1111/tmi.13192 (2018).
  35. Bens, C.C.P.M., Voss, A., Klaassen, C.H.W. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol*. **44**(5), 1875-1876 (2006).
  36. Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis*. **13**(2), 255-258 (2007).
  37. Chung, M., et al. 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. *Microb Drug Resist*. **6**, 189–198 (2000).
  38. Bonesso, M.F., et al. Key role of  $\alpha$ -toxin in fatal pneumonia caused by sequence type 398. *Amer J Respirat and Critl Care Med*. **193**, 217-220 (2016).
  39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Panorama do município de Botucatu, SP [Accessed November 10, 2018]. Available at: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/botucatu/panorama>.
  40. Konemann, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., Sommer, H.M. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido*. 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi. (2001).
  41. Cunha, M.L.R.S., Sinzato, Y.K., Silveira, L.V. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococci*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **99**(8), 855-860 (2004).
  42. Mason, W.J., et al. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol*. **39**(9). 3332-3338 (2001).
  43. Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of

- Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol.**36**(3). 618–23 (1998).
44. Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol.**29**(10), 2240-2244 (1991).
  45. Oliveira, D.C., de Lencastre, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Ag Chem.**46**(7), 2155-2161 (2002).
  46. Milheiriço, C., Oliveira, D.C., de Lencastre, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Ag Chem.**51**(9), 3374-3377 (2007).
  47. McDougal, L.K., et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol.**41**(11), 5113-5120 (2003).
  48. Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol.**38**(3), 1008-1015 (2000).

## 5.2 Artigo II

### DETERMINAÇÃO DO PERFIL PATOGÊNICO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA PROVENIENTES DA MUCOSA NASAL E OROFARÍNGEA DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS INSULINO-DEPENDENTES.

Nathalia Bibiana Teixeira\*<sup>1,2</sup>, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza<sup>1</sup>, Matheus Cristovam de Souza<sup>2</sup>, Thais Aline Monteiro Pereira<sup>2</sup>, Bibiana Prada de Camargo Colenci<sup>3</sup>, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

**\*Autor correspondente:**

Nathalia Bibiana Teixeira

Fone: +55 14 3880 0428

E-mail: [na\\_tx0402@yahoo.com.br](mailto:na_tx0402@yahoo.com.br)

## Resumo

**Introdução:** Portadores de diabetes mellitus, em especial, os insulino-dependentes, são grupos de risco para infecções estafilocócicas. A patogenicidade de *Staphylococcus aureus* está relacionada à presença de fatores de virulência que favorecem sua permanência no hospedeiro e podem aumentar a gravidade das infecções. **Objetivo:** analisar o potencial patogênico de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (MSSA e MRSA) isolados de indivíduos diabéticos, através da detecção dos genes codificadores das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*), hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*) e biofilme (operon *icaADBC*). **Materiais e métodos:** Foram estudados 112 isolados de *S. aureus* obtidos da mucosa nasal e orofaríngea de 312 indivíduos diabéticos insulino-dependentes de Botucatu-SP, Brasil. A detecção do gene *mecA* e dos genes de virulência foi realizada pela técnica de PCR. **Resultados:** Dos 112 isolados de *S. aureus*, 15 eram MRSA (gene *mecA* +). A análise dos fatores de virulência demonstrou que tanto MSSA quanto MRSA apresentaram alta prevalência de isolados carregando genes do biofilme, das hemolisinas alfa e delta e da enterotoxina A. Não foram encontrados isolados carregando os genes da esfoliatina B e *pvl*. **Conclusão:** A análise do perfil de virulência revelou elevado potencial patogênico de MRSA e MSSA carregados pelos diabéticos. Uma vez que esses indivíduos são mais suscetíveis às infecções persistentes, a colonização com cepas potencialmente patogênicas pode contribuir para disseminação e dificuldade no tratamento de infecções na população estudada.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, diabéticos insulino-dependentes, MRSA, MSSA, patogenicidade

## Abstract

**Introduction:** Individuals with diabetes mellitus, especially insulin-dependent patients, are at-risk groups for staphylococcal infections. The pathogenicity of *Staphylococcus aureus* is related to the presence of virulence factors that favor its permanence in the host and can increase the severity of the infections. **Objective:** To analyze the pathogenic potential of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* (MSSA and MRSA) isolated from diabetic individuals by detecting enterotoxin (*sea*, *seb* and *sec-1*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), exfoliatins (*eta* e *etb*), leukocidin of Pantone-Valentine (*pvl*), alfa-hemolysins and delta-hemolysins (*hla* and *hld*), and biofilm (operon *icaADBC*). **Materials and methods:** 112 isolates of *S. aureus* obtained from the nasal and oropharyngeal mucosa of 312 insulin-dependent diabetic individuals from Botucatu/SP, Brazil were studied. Detection of the *mecA* gene and virulence genes was performed by the PCR technique. **Results:** Of the 112 *S. aureus* isolates, 15 were MRSA (*mecA* +). The analysis of the virulence factors showed that both MSSA and MRSA had a high prevalence of isolates carrying biofilm genes, alpha and delta hemolysin and enterotoxin A genes. No isolates were found carrying the exfoliatin B gene and *pvl*. **Conclusion:** The analysis of the virulence profile revealed a high pathogenic potential of MRSA and MSSA carried by diabetics. Since these individuals are more susceptible to persistent infections, colonization with potentially pathogenic strains may contribute to dissemination and difficulty in treating infections in the population studied.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, insulin-dependent diabetics, MRSA, MSSA, pathogenicity

## Introdução

O diabetes *melittus* é uma doença crônica de grande impacto mundial destacando-se como importante causa de morbidade e mortalidade<sup>1</sup>. Indivíduos com comprometimento do sistema imunológico, como os diabéticos, apresentam risco aumentado para infecções, incluindo as estafilocócicas, devido à hiperglicemia e acidose<sup>2,3</sup>. Além disso, diabéticos frequentemente apresentam neuropatias e diminuição do fluxo sanguíneo nas extremidades, acarretando em feridas de cicatrização lenta que podem ser facilmente colonizadas e/ou infectadas por *Staphylococcus aureus*<sup>3,4</sup>.

Estudos relatam que a prevalência de colonização nasal por *S. aureus* é mais elevada em portadores de diabetes do que em indivíduos não diabéticos e que a colonização por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) aumenta o risco de infecções<sup>5,6</sup> e está significativamente associada à morbidade e mortalidade nesses indivíduos<sup>7,8,9</sup>.

A patogênese de *S. aureus* é determinada pelos numerosos fatores de virulência produzidos pela bactéria. Destacam-se as toxinas com atividade de superantígenos como as enterotoxinas estafilocócicas, a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as toxinas esfoliativas que levam a uma ativação inespecífica de células T com produção exacerbada de citocinas; e as citotoxinas (alfa-hemolisina, delta-hemolisina e leucocidina de Pantón-Valentine) com capacidade de lisar células do hospedeiro e evadir da resposta imune<sup>10,11</sup>.

Outro fator de virulência importante é a capacidade de formação de biofilme por esses micro-organismos, permitindo a adesão a superfícies bióticas e abióticas, colonização persistente e evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Estudos sugerem que a presença de biofilme estafilocócico atua como uma barreira à migração celular, impedindo a fagocitose e estimulando um estado inflamatório crônico<sup>12-15</sup>, além disso, bactérias que formam biofilme podem tornar-se até 1000 vezes mais tolerantes à ação de agentes antimicrobianos<sup>16</sup>.

A colonização com isolados de *S. aureus* virulentos, sejam eles sensíveis ou resistentes à meticilina, aumentam o risco de infecções graves. Considerando que indivíduos diabéticos, principalmente os que fazem uso diário de insulina são grupos de risco para colonização pelo patógeno, o objetivo do presente estudo foi analisar o

potencial patogênico de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (MSSA e MRSA) isolados desses indivíduos.

## **Materiais e métodos**

### **Coleta dos espécimes microbiológicos**

Foram coletadas amostras das mucosas nasal e oral de 312 indivíduos diabéticos insulino-dependentes residentes no município de Botucatu, SP, Brasil, através de *swab*sestéreis com meio de transporte. Os espécimes foram obtidos das narinas anteriores e orofaringe, utilizando um *swab* para cada sítio.

A técnica de coleta nasal consistiu na umidificação do *swab* com solução fisiológica 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas às narinas e rotação da haste pressionando gentilmente a extremidade contra a mucosa. O procedimento para coleta de orofaringe consistiu na umidificação do *swab*, comprimindo o mesmo de forma suave sobre toda superfície da garganta, evitando o contato do coletor com a língua.

Os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, para realização de semeadura em placas contendo ágar Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 48 horas as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos microrganismos isolados.

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

Os microrganismos foram submetidos à coloração de Gram objetivando-se a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram realizadas as provas de catalase e coagulase em tubo e as provas bioquímicas maltose, trealose e manitol para diferenciação de *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.<sup>18,19</sup>

Após a extração do DNA com Kit Illustra (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), a confirmação genotípica para os isolados de *S. aureus* foi realizada através da detecção do gene que codifica o RNAr16S<sup>20</sup> e o fragmento de DNA SA442 específico de *S. aureus*<sup>21</sup>. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos para a identificação genotípica de *Staphylococcus aureus*

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
16S RNAr 1	5' – CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG – 3'	791 pb
16S RNAr 2	5' – CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG – 3'	
SA442 1	5' – AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG – 3'	241 pb
SA442 2	5' – CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA – 3'	

Fonte: Mason et al<sup>20</sup>; Martineau et al<sup>21</sup>

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

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Murakami et al.<sup>22</sup> Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional, como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). A Tabela 2 mostra a sequência dos primers utilizados para amplificação do gene *mecA* e o tamanho do produto gerado.

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

Primer	Sequência de nucleotídeos	Produto amplificado
<i>mecA1</i>	5' – AAAATCGATGGTAAAGGTTGG – 3'	533 pb
<i>mecA2</i>	5' – AGTTCTGCAGTACCGGATTTG – 3'	533 pb

Fonte: Murakami et al<sup>22</sup>

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

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se o método de reação de PCR Multiplex, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>23</sup> e atualizado por Milheiriço et al.<sup>24</sup> Os primers utilizados estão descritos na Tabela 3.

Como controle para a tipagem do SCC*mec* foram utilizadas as cepas COL para SCC*mec* tipo I; N315 para SCC*mec* tipo IA; PER34 para o SCC*mec* tipo II; AN546 para o SCC*mec* tipo III; HU25 para o SCC*mec* tipo IIIA e MW2 para o SCC*mec* tipo IV.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos para a tipagem de SCC*mec*

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

Fonte: Oliveira e Lencastre<sup>23</sup>; Milheiriço et al<sup>24</sup>.

### Detecção dos genes envolvidos na formação de biofilme

As reações de PCR para a detecção dos genes codificadores do biofilme e o primers utilizados (Tabela 4) foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Arciola et al.<sup>25</sup> e Rohde et al. 2007<sup>26</sup>. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo e negativo, *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para detecção dos genes envolvidos na formação de biofilme.

<b>Primer</b>	<b>Sequência de nucleotídeos (5' - 3')</b>	<b>Amplicon</b>
<i>icaA1</i>	TGG CTG TAT TAA GCG AAG TC	669 pb
<i>icaA2</i>	CCT CTG TCT GGG CTT GAC C	669 pb
<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198 pb
<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	198 pb
<i>icaB1</i>	CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA	302 pb
<i>icaB2</i>	AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT	302 pb
<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400pb
<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	400pb

Fonte: Arciola et al<sup>25</sup> e Rohde et al. 2007<sup>26</sup>

### **Pesquisa de genes das toxinas estafilocócicas**

As reações de PCR para os genes das hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), assim como os primers utilizados, foram realizadas de acordo com Marconi et al<sup>27</sup>. As reações de amplificação dos genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec-1*), e para o gene da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) foram realizadas segundo Cunha et al<sup>28</sup> e Johnson et al.<sup>29</sup> As reações para o gene leucocidina Pantone-Valentine (*pvl*) e genes das toxinas esfoliativas (*eta*, *etb*), conforme descrito por Tristan et al<sup>30</sup> e Koning et al<sup>31</sup>. A Tabela 5 demonstra a sequência de primers utilizados, o tamanho do amplicon e as cepas utilizadas como controles.

**Tabela 5.** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de genes de hemolisinas e toxinas.

Fator de virulência	Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Produto amplificado	Controle
Enterotoxina A	<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120pb	ATCC 13565
		SEA-2	GAACCTTCCATCAAAAACA		
Enterotoxina B	<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478pb	ATCC 14458
		SEB-2	GACGGTACTCTATAAGTGCC		
Enterotoxina C	<i>Sec-1</i>	SEC-1	GACATAAAAAGCTAGGAATTT	257pb	ATCC 19095
		SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC		
Tox. 1 da Sínd. Choque Tóxico	<i>tsst</i>	TSST-1	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350pb	N315
		TSST-2	TTTCCAATAACCACCCGTTT		
Toxina Esfoliativa A	<i>eta</i>	ETA-1	CTAGTGCATTGTATTCAA	119pb	N5
		ETA-2	TGCATTGACACCATAGTACT		
Toxina Esfoliativa B	<i>etb</i>	ETB-1	ACGGCTATATACATTCAATT	200pb	ZM
		ETB-2	TCCATCGATAATATACCTAA		
Hemolisina alfa	<i>hla</i>	HLA-1	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209pb	N315
		HLA-2	CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
Hemolisina delta	<i>hld</i>	HLD-1	ATGGCAGCAGATATCATTTTC	357pb	N315
		HLD-2	CGTGAGCTTGGGAGAGAC		
Leucocidina de Panton Valentine	LukPV	LUK-PV1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGA	433 pb	ATCC 49775
		LUK-PV2	TCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		

### Visualização dos produtos amplificados

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

### PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

Todos os isolados de *S. aureus* foram tipados através do *Pulsed-Field Gel Eletroforesis* (PFGE) utilizando o protocolo modificado de McDougal et al.<sup>32</sup>

As amostras foram colocadas em caldo BHI para o crescimento durante 24

horas. Em um microtubo, foram adicionados 400µl da amostra e centrifugada à 12.000 rpm por 50 segundos. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]). As amostras foram deixadas em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Após agitação em vortex, foram adicionados 5µl de lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e 300µl de agarose *lowmelt*.

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

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

A análise de similaridade foi realizada utilizando-se o software *BioNumerics* (versão 7.6; AppliedMaths, Bélgica). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustada para 1,2% e 1% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq$ 80% foi escolhido para determinação dos *clusters*.

Quarenta e cinco isolados, dos quais um era MRSA, não puderam ser tipados utilizando a enzima *SmaI*, no entanto, a tipagem foi possível através da digestão com a enzima *ApaI*.

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

O MLST foi realizado segundo as normas descritas por Enright et al.<sup>33</sup>Cada par de *primer* amplifica um fragmento interno do gene *housekeeping* (cerca de 500 pb), estes são demonstrados na Tabela 6: carbamatoquinase (*arcC*) desidrogenase, do chiquimato (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilatoquinase (*gmk*), acetiltransferase fosfato (*pta*), triosefosfatoisomerase (*tpi*), e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*).

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

**Tabela 6.** Sequência de primers utilizados na PCR

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

### Reação de sequenciamento

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

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software EPI-INFO para Windows, versão 7.2.6 (© Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA).

Para comparação entre variáveis dicotômicas, foram utilizados testes não paramétricos de proporção,  $X^2$  e Teste Exato de Fisher.

### Questões éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Brasil (nº do parecer: 1.107.685).

### Resultados

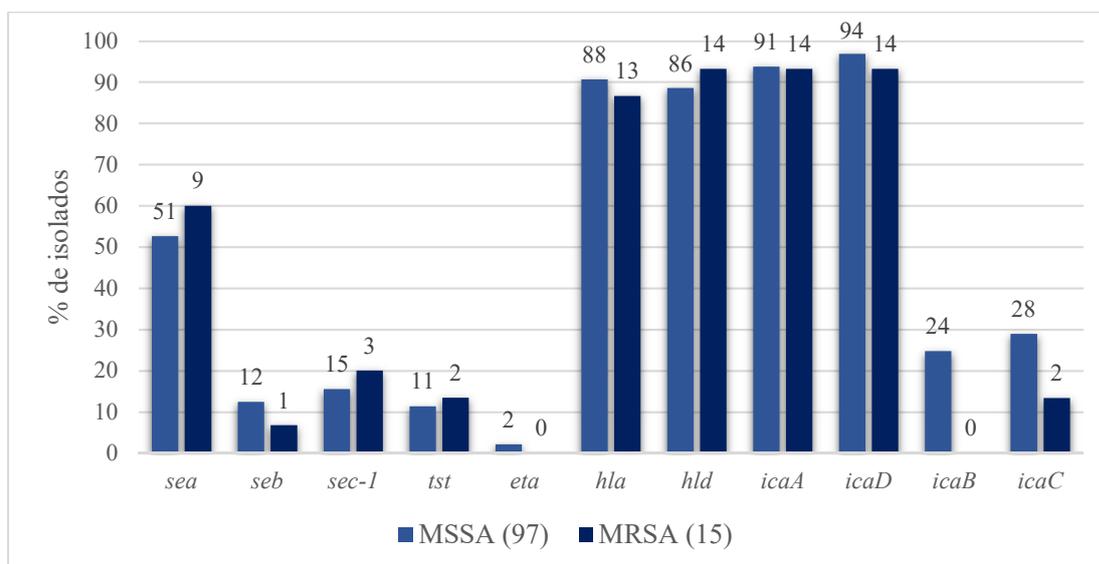
Foram incluídos no estudo 112 isolados obtidos a partir de *swab* nasal e orofaríngeo de 312 indivíduos. Destes, 15 (13,4%) eram carreadores do gene *mecA*, sendo, portanto, MRSA, o restante dos 97 (86,6%) isolados foram sensíveis à meticilina (MSSA). Analisando separadamente os isolados de MRSA, obteve-se nove isolados (60%) provenientes da mucosa nasal e 6 (40%) provenientes da mucosa orofaríngea. Quanto aos MSSA, 52 isolados (53,6%) eram provenientes da mucosa nasal e 45 (46,4%) da mucosa orofaríngea. Dezesesseis indivíduos apresentaram *S. aureus* em ambos os sítios de coleta (nasal/oral) e um dos indivíduos apresentou MRSA na mucosa nasal e MSSA na mucosa orofaríngea.

Em relação à pesquisa de genes das toxinas com atividade de superantígenos observou-se que 53,6% (60) carregavam o gene *sea*, 11,6% (13) foram positivos para o gene *seb* e 16,1% (18) carregavam o gene *sec-1* das enterotoxinas. Vale ressaltar que 66,1% (74) dos isolados foram positivos para pelo menos um dos genes codificadores das enterotoxinas testadas, embora apenas um isolado tenha carregado os três genes simultaneamente. A frequência de isolados carregando o gene para toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) foi de 11,6% (13) enquanto que apenas 1,8% (2) dos isolados foram positivos para o gene da esfoliatina A (*eta*). Nenhum dos isolados carregava o gene da esfoliatina B (*etb*).

Quanto às hemolisinas, a análise revelou que 90,1% (101) dos isolados foram positivos para *hla* e 89,2% (100) carregavam o gene *hld*. Pôde-se observar que 96,4% (108) carregavam pelo menos um dos genes das hemolisinas testadas. Nenhum isolado carregava o gene da Leucocidina de Pantón Valentine (*pvl*).

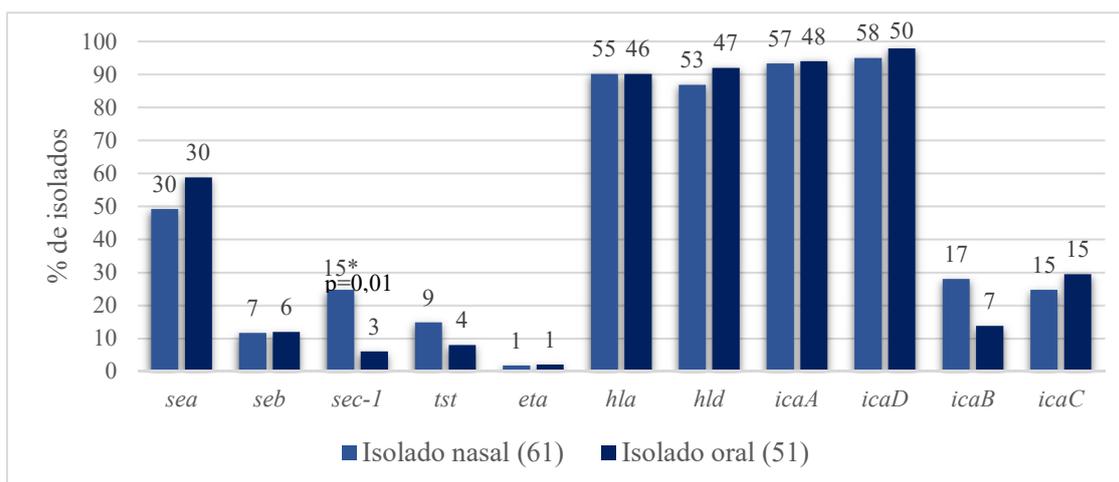
Em relação aos genes relacionados com a produção de biofilme, notou-se que apenas 6,2% (7) dos isolados carregavam o operon *icaADBC* completo, porém 93,7% (105) carregavam os genes *icaA* e *icaD* simultaneamente. Analisando os genes separadamente, observou-se que 93,7% (105) dos isolados eram positivos para o gene *icaA*, 96,4% (108) carregavam o gene *icaD*, 21,4% (24) carregavam o gene *icaB* e 26,8% (30) carregavam o gene *icaC* do biofilme. Vale lembrar que os genes *icaA* e *icaD* são essenciais para formação e funcionamento do biofilme por isolados de *S. aureus*.

A prevalência dos fatores de virulência entre os isolados de MSSA e MRSA é demonstrada na Figura 1 sem diferença significativa para nenhum dos genes pesquisados. A comparação entre a presença dos fatores de virulência nos isolados de *S. aureus* provenientes da mucosa nasal e orofaríngea revelou diferença significativa apenas para o gene da enterotoxina C (*sec-1*) com  $p=0,01$  (Figura 2).



**Nota.** Genes pesquisados quanto a virulência dos isolados de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb* e *sec-1*). Gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*). Gene codificador da esfoliatina A (*eta*). Genes das citotoxinas, alfa hemolisina (*hla*) e delta hemolisina (*hld*). Genes relacionados à produção de biofilme (operon *icaADBC*). O eixo y está expresso em porcentagem e o rótulo de dados está em número absoluto de isolados.

**Figura1.** Pesquisa dos genes de virulência em isolados de MSSA e MRSA provenientes de indivíduos diabéticos insulino-dependentes.



**Nota.** Genes pesquisados quanto a virulência dos isolados de *S. aureus* de acordo com sítio de coleta. Enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb* e *sec-1*). Gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*). Esfoliatina A (*eta*). Genes das citotoxinas, alfa hemolisina (*hla*) e delta hemolisina (*hld*). Genes relacionados à produção de biofilme (operon *icaADBC*). \*Diferença significativa  $p=0,01$ . O eixo y está expresso em porcentagem e o rótulo de dados está em número absoluto de isolados.

**Figura 2.** Comparação entre os genes de virulência dos isolados encontrados na mucosa nasal e orofaríngea de indivíduos diabéticos insulino-dependentes.

Quanto a análise do perfil clonal, entre os isolados de MRSA foi obtido um *cluster* com cinco isolados (A), sendo que quatro desses apresentaram 100% de similaridade (659N, 665N, 555N, 554O) e um *cluster* com três isolados (B), com 100% de similaridade entre dois deles (72O e 615N). Todos os isolados do *cluster* A e B de MRSA apresentaram os genes *icaA* e *icaD* para formação de biofilme e o gene *hld* codificador da hemolisina delta. Também foram detectados os genes *sea* em três isolados, o gene *seb* em um isolado, o gene *sec-1* em dois isolados e o gene da hemolisina alfa (*hla*) em sete isolados. Um dos isolados de MRSA, não foi tipado com a enzima *SmaI* sendo posteriormente tipado com *ApaI*. Esse isolado carregava o gene *icaA* e *icaD* do biofilme, o gene da enterotoxina A (*sea*) e o gene das hemolisinas alfa (*hla*) e delta (*hld*) (Tabela 7).

Importante ressaltar que dois isolados de cada *cluster* foram selecionados para caracterização através da técnica de MLST sendo possível observar uma prevalência de *Sequence Types* (ST) ST 5 em dois isolados do *cluster* A e em um isolado do *cluster* B seguido de um isolado tipado como ST 8. Além destes, o isolado 735N tipado após restrição com a enzima *ApaI* pela técnica de PFGE, também foi caracterizado por MLST como ST398, pertencente a uma importante linhagem clonal associada à disseminação entre seres humanos e animais (Tabela 7).

**Tabela 7.** Perfil de virulência dos *Clusters* A e B de MRSA tipados por PFGE e MLST.

PFGE	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	Tipo de SCC <i>mec</i>	ST	Genes de virulência
<b>ClusterA</b>	659N	+	IV	5	<i>icaA, icaD, sea, seb, hld</i>
	665N	+	IV	-	<i>icaA, icaD, sea, hla, hld</i>
	555N	+	IV	-	<i>icaA, icaD, hla, hld</i>
	554O	+	IV	-	<i>icaA, icaD, hla, hld</i>
	639O	+	IV	5	<i>icaA, icaD, sec-1, hla, hld</i>
<b>ClusterB</b>	72O	+	IV	8	<i>icaADC, sec-1, hla, hld</i>
	615N	+	I	5	<i>icaAD, tst, hla, hld</i>
	637O	+	I	-	<i>icaADC, sea, hla, hld</i>
	735N*	+	IV	398	<i>icaAD, sea, hla, hld</i>

**Nota.**PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, MLST: *Multilocus Sequence Typing*, ST: *Sequence Types*. Isolados de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) baseados na detecção do gene *mecA* agrupados por PFGE com > 80% de similaridade. *Cluster A*=Todos os isolados apresentando SCC*mec* tipicamente comunitário (Tipo IV), dois deles tipados por MLST como ST5. *Cluster B*=Presença de SCC*mec* tipo I e IV entre isolados tipados como ST5 e ST8, respectivamente. \*Isolado tipado após restrição com *Apal* pela técnica de PFGE apresentando ST398. N= mucosa nasal. O= mucosa orofaríngea. *icaA/icaD*=genes codificando para formação de biofilme. *sea*= gene da enterotoxina A. *sec-1*= gene da enterotoxina C. *hla*= gene da hemolisina alfa. *hld*= gene da hemolisina delta.

Já as amostras de MSSA apresentaram maior diversidade entre os isolados, sendo encontrados 4 *clusters* com baixo número de amostras (A, B, C e D). Os *clusters* também apresentaram um importante arsenal de genes de virulência, com destaque para o *cluster A* com dois isolados com o operon *ica* completo (*icaADBC*), genes das enterotoxinas A e B e das hemolisinas alfa e delta, e o *cluster B* com um isolado apresentando o operon *ica* completo, gene da enterotoxina A (*sea*), gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) e os genes *hla* e *hld* das hemolisinas (Tabela 8).

**Tabela 8.** Perfil de virulência dos *Clusters* majoritários de MSSA tipados por PFGE.

PFGE	MSSA	Genes de virulência
Cluster A	679N	<i>icaADB, seb, hla, hld</i>
	680O	<i>icaADB, hla, hld</i>
	248N	<i>icaADBC, sea, seb, hla, hld</i>
	248O	<i>icaADBC, sea, seb, hla, hld</i>
Cluster B	682N	<i>icaADB, sea, hla, hld</i>
	682O	<i>icaADB, sea, hla, hld</i>
	65N	<i>icaADBC, sea, tst, hla, hld</i>
Cluster C	646N	<i>icaADB, seb, hla, hld</i>
	647.O	<i>icaAD, sea, seb, hla, hld</i>
	311N	<i>icaAD, seb, hla, hld</i>
	633N	<i>icaAD, sec-1, hla, hld</i>
Cluster D	26O	<i>icaAD, sea, hla, hld</i>
	636O	<i>icaAD, sea, hla, hld</i>
	421O	<i>icaADB, hld</i>

**Nota.**PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. Perfil de virulência dos isolados de *S. aureus* sensíveis à metilina (MSSA) tipados por PFGE + *SmaI* com > 80% de similaridade. N= mucosa nasal, O= mucosa orofaríngea. *icaA/icaD/icaB/icaC*=genes codificando para formação de biofilme, *sea*= gene da enterotoxina A, *seb*= gene da enterotoxina B, *sec-1*= gene da enterotoxina C, *hla*= gene da hemolisina alfa, *hld*= gene da hemolisina delta.

Ainda com relação as amostras de MSSA, foi possível agrupar os 45 isolados tipados após restrição com a enzima *ApaI* pela técnica de PFGE, em três *clusters* majoritários (A, C e D) e três *clusters* com menor número de amostras (B, E, F). Com exceção de dois isolados, todos apresentaram os genes *icaA* e *icaD* do biofilme, e os genes *hla* e *hld* das hemolisinas. Além desses, dois isolados do *cluster* A apresentam o operon *ica* (*icaADBC*) completo e o gene *hld* da hemolisina delta. Embora com menor frequência, também foram encontrados isolados carregando os genes *sea* (17), *seb* (1) e *sec-1* (4) das enterotoxinas e o gene *tst* (1) da toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

Posteriormente foram selecionados desses *clusters* quatro isolados para caracterização por MLST, sendo possível obter três isolados tipados como ST398. Um isolado possuiu alteração em uma das bases do gene *arcC* e, portanto, ainda não foi possível obter seu *sequence type* do banco de dados do MLST, pois será enviada para o curador do banco de dados do MLST (<http://www.mlst.net>) para identificação de novo ST (Tabela 9).

**Tabela 9.** Características dos isolados com perfil PFGE+*Apal* tipados pela técnica de MLST

MSSA	<i>Genes housekeeping</i>							ST	Genes de virulência
	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>		
695O	3	35	19	2	20	26	39	<b>398</b>	<i>icaAD, hla, hld</i>
715N	3	35	19	2	20	26	39	<b>398</b>	<i>icaAD, sea, hla, hld</i>
762O	3	35	19	2	20	26	39	<b>398</b>	<i>icaAD, sea, seb, hla, hld</i>
700O	<b>26</b>	35	19	2	20	26	39	-	<i>icaADC, hla</i>

**Nota.** Isolados que foram caracterizados através da técnica de MLST. N=mucosa nasal. O=mucosa orofaríngea.

*arcC*= gene carbamato quinase, *aroE*=gene desidrogenase do chiquimato, *glpF*=glicerol quinase, *gmk*=guanilato quinase, *pta*=fosfato acetiltransferase, *tpi*=triose-fosfato isomerase, *yqiL*=acetil coenzima A. ST= *sequence types*.

*icaA/icaD*=genes codificando para formação de biofilme, *sea/seb*= genes codificadores das enterotoxinas A e B, *hla*= gene da hemolisina alfa, *hld*= gene da hemolisina delta.

## Discussão

A patogenicidade de *S. aureus* está relacionada a numerosos fatores de virulência expressos pela bactéria, os quais possibilitam a adesão a superfícies bióticas e abióticas, disseminação, danos celulares e evasão do sistema imunológico do hospedeiro<sup>34,35</sup>

Quanto a distribuição dos fatores de virulência, no geral pudemos observar uma maior prevalência de genes associados a formação do biofilme, com predominância dos genes *icaA* (93,7%) e *icaD* (96,4%). Ambos são fatores essenciais para o processo de adesão intracelular, e, portanto, exercem papel fundamental na formação da multicamada do biofilme, sendo esse fator de extrema importância para colonização e persistência do microrganismo, permitindo a evasão do sistema imune e proteção contra ação de antimicrobianos.<sup>36,37</sup> Estudos prévios encontraram alta prevalência desses genes em *S. aureus* e relatam a presença concomitante dos genes *icaA* e *icaD* e

a produção fenotípica do biofilme<sup>38-39</sup>. Na formação do biofilme, para formar as camadas bacterianas, as células vão se ligando umas as outras através do PIA (polissacarídeo de adesão intercelular), uma molécula polissacarídica que favorece a adesão entre as células. O PIA é sintetizado a partir de UDP-N-acetilglicosamina por uma enzima N-acetilglicosaminatransferase, a qual é codificada pelos lócus de adesão intercelular (*ica*), em particular pelo *icaA*. A expressão única deste gene induz uma baixa atividade enzimática produzindo baixa quantidade do polissacarídeo. Entretanto, a expressão simultânea do *icaA* e do *icaD* promovem um aumento significativo da N-acetilglicosaminatransferase, que atua formando oligômeros com 10-20 resíduos aproximadamente de  $\beta$ -1,6-N-acetilglicosamina.<sup>40-41</sup> Foi demonstrado que *icaD* sozinho não induz atividade enzimática de transferase, enquanto que o *icaA* isolado induz pouca atividade. Entretanto, quando *icaA* e *icaD* são expressos conjuntamente, a atividade enzimática da transferase é aumentada, formando maior quantidade de PIA. Outra possibilidade proposta é que a proteína transcrita por *icaA*, uma proteína transmembrana que contém aproximadamente 412 aminoácidos, necessita de *icaD* para obter uma conformação ativa.<sup>42</sup>

Outro dado importante foi a prevalência de genes das hemolisinas alfa (90,1%) e delta (89,2%), sem diferença estatística de prevalência entre isolados sensíveis e resistentes. As hemolisinas estão entre os principais fatores de virulência na patogênese de *S. aureus*, tendo papel na disseminação do microrganismo por promover a lise de hemácias, leucócitos e fibroblastos através da formação de poros nas membranas das células alvo.<sup>43,44</sup> Em estudo recente, Bonesso et al<sup>45</sup> confirmaram o papel crucial da alfa hemolisina em infecções pulmonares associadas à ventilação mecânica causadas por *S. aureus* produtores dessa citotoxina, não somente em MRSA, mas também em MSSA. Esse dado reforça a ideia de que isolados de MSSA carreando fatores de virulência podem causar infecções tão graves e de difícil tratamento, como as causadas por MRSA.

Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Djahmi et al<sup>46</sup>. Os autores relatam uma alta prevalência de *hla* em *S. aureus* isolados de pacientes ambulatoriais com úlceras de membros inferiores, porém relatam que esse gene foi significativamente mais encontrado em isolados de MSSA (100%) que em MRSA (16,4%). Segundo Dunyach-Remyet al<sup>47</sup> as infecções do pé diabético apresentam grau

de gravidade similar entre MRSA e MSSA, exceto quando a  $\alpha$ -hemolisina está presente, aumentando a patogenicidade de isolados de MSSA.

Em contraste com outros estudos conduzidos na mesma região, não foi encontrado nenhum isolado carreando o gene da Leucocidina de Panton Valentine (*pvl*)<sup>48-50</sup>. A PVL é uma leucotoxina bicomponente formadora de poros com a habilidade de lisar leucócitos e é codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*. Sua apresentação clínica em humanos é a infecção severa de pele e tecidos moles e/ou pneumonia necrotizante<sup>51</sup>. Souza et al<sup>52</sup>, trabalhando com isolados de *S. aureus* de diferentes origens, notaram a presença de isolados positivos para *pvl* apenas em pacientes dermatológicos com infecção primária ou secundária.

Em relação aos genes das enterotoxinas, foi encontrado maior prevalência do gene codificador da enterotoxina A (53,6%) nos *S. aureus* isolados no estudo. Os genes *seb* e *sec-1* foram menos frequentes, com 11,6% (13) e 16,1% (18) de positividade, respectivamente. Nossos achados estão de acordo com Lim et al<sup>53</sup>, que também relataram alta prevalência do gene *sea* entre os isolados de MSSA e MRSA. Estudos sugerem que o gene *sea* é significativamente mais prevalente em *S. aureus* isolados de úlceras profundas e que podem representar um biomarcador para diferenciar colonização e infecção em pacientes diabéticos com úlcera de membros inferiores<sup>4</sup>. Houve uma menor positividade para o gene codificador da toxina 1 da síndrome do choque tóxico, com apenas 11,6% (13) dos isolados carreando o gene *tst*.

Segundo estudos publicados anteriormente, a prevalência dos genes *eta* e *etb* varia de 0,5% a 3% entre isolados de MSSA, sendo que em isolados de MRSA, essa prevalência gira em torno de 10%<sup>4</sup>. No presente estudo apenas 1,8% (2) dos MSSA carreavam o gene da esfoliatina A, sendo que nenhum deles apresentou o gene da esfoliatina B, e nenhum MRSA dos 15 encontrados nesse estudo apresentou os genes dessas toxinas. Esses achados contrastam também com o relato de Post et al<sup>54</sup> que demonstraram presença importante dos genes *eta* (13%) e *etb* (17%) em isolados clínicos de *S. aureus*.

A presença de genes com atividade de superantígeno em isolados de *S. aureus* colonizando indivíduos diabéticos aumenta a possibilidade de disseminação de cepas virulentas, consequentemente aumentando a chance de infecções mais graves uma vez

que esses fatores induzem a ativação de células T com secreção exacerbada de citocinas que podem levar a quadros graves de sepse.<sup>20</sup>

Quanto a tipagem molecular dos isolados de MRSA, nossos achados estão de acordo com Pereira-Franchi et al.<sup>55</sup> que relatam a presença de isolados contendo ST5-SCC*mec* Tipo IV e ST8-SCC*mec* Tipo IV contendo os genes *icaA*, *icaD*, *hla*, *hld* e genes das enterotoxinas (*sea*, *seb* e/ou *sec-1*) provenientes de indivíduos atendidos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Botucatu sugerindo uma possível persistência desses clones na comunidade. Diferente dos nossos achados, os autores relatam associação entre ST5 e SCC*mec* II albergando os mesmos fatores de virulências citados acima. Pires et al.<sup>56</sup> também relataram a presença de isolados de MRSA ST5-SCC*mec* Tipo IV entre indivíduos saudáveis da comunidade de Botucatu.

Embora não tenha havido diferença significativa na presença de genes de virulência entre isolados de MRSA e MSSA, foi possível observar a presença de isolados sensíveis virulentos colonizando indivíduos diabéticos da comunidade. A presença de isolados contendo ST398, revela a importância desse grupo. A linhagem ST398 é tipicamente relacionada à animais rurais tanto em isolados resistentes (MRSA) quanto sensíveis (MSSA) porém apenas os MSSA ST398 são relacionados à disseminação entre seres humanos<sup>57,58</sup>. Em estudo recente, Bonesso et al.<sup>45</sup> trabalhando com isolados de pacientes que utilizavam ventilação mecânica hospitalizados na unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital da Clínica da UNESP de Botucatu, relatam que pacientes colonizados por esta linhagem desenvolveram pneumonia com elevada taxa de mortalidade. Assim como em estudo de Bonesso et al.<sup>45</sup> todos os ST 398 identificados apresentaram o gene da citotoxina alfa (*hla*), além dos genes *hld* e *icaAD* indicando alto potencial patogênico dessa linhagem.

O perfil de virulência de clones majoritários de MRSA e MSSA isolados de indivíduos diabéticos insulino-dependentes, demonstrado pela presença de genes codificadores das hemolisinas, genes relacionados à produção de biofilme e genes relativos às demais toxinas demonstram o elevado potencial patogênico de *S. aureus* carregados pelos diabéticos, sugerindo que a colonização com essas cepas resistentes e virulentas pode implicar em maior persistência e disseminação, bem como a possibilidade de evoluir para infecções mais graves e de maior dificuldade de tratamento. Medidas de controle como programas de educação continuada para profissionais da saúde e funcionários das unidades básicas de Saúde e a descolonização

dos indivíduos podem ser uteis para reduzir a disseminação do patógeno entre os diabéticos.

## **Conclusão**

O presente estudo revelou alta patogenicidade dos isolados de MSSA e MRSA provenientes de indivíduos diabéticos, ressaltando a importância do MSSA. A virulência de microrganismos sensíveis tem papel fundamental na evolução das infecções e, portanto, devem ser analisados em conjunto com a resistência à antimicrobianos. Isolados que agruparam pela técnica de PFGE e foram tipados por MLST apresentaram semelhanças em seus perfis de virulência reforçando a ideia de transmissão de cepas virulentas entre a população estudada. Muitos isolados que agruparam pela técnica de PFGE apresentaram similaridade com a cepa ST398, que é reconhecidamente virulenta. Uma vez que esses indivíduos têm maior predisposição às infecções, essa disseminação poderia resultar em alto risco do desenvolvimento de infecções graves aliados à dificuldade de tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes.

## Referências

1. Flor LS, Campos MR. Prevalência de diabetes melittus e fatores associados na população adulta brasileira: evidencias de um inquérito de base populacional. *Ver Bras Epidemiol.* 2017; 20(1): 16-29.
2. Rocha JLL, Baggio HCC, Cunha CA, Niclewicz EA, Leite SAO, Baptista MIDK. Aspectos Relevantes da Interface Entre Diabetes Mellitus e Infecção. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(3): 221-229.
3. Trivedi U, Parameswaran S, Armstrong A, Burgueno-Veja D, Griswold J, Dissanaik S, Rumbaugh K.P. Prevalence of Multiple Antibiotic Resistant Infections in Diabetic versus Nondiabetic Wounds. *J Pathog.* 2014; 2014: 1-6.
4. Dunyach-Remy C, Essebe CN, Sotto A, Lavigne JP. *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. *Toxins.* 2016; 8: 209.
5. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 751–762
6. Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 2001; 344: 11–16.
7. Alizargar J, Sharif M, Sharif A. Risk Factors of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Diabetic Outpatients, A Prospective Cohort Study. *Int J Microbiol Res.* 2013. 4: 147-51
8. Kutlu SS, Cevahir N, Akalin S, Akin F, Caylak SD, Bastemir M, Tekin K. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a diabetic outpatient population: a prospective cohort study. *Am J. Infect Control.* 2012; 40: 365-8.
9. Chaudhry WN, Badar R, Jamal M, Jeong J, Zafar J, Andleeb S. Clinico-microbiological study and antibiotic resistance profile of *mecA* and ESBL gene prevalence in patients with diabetic foot infections. *Experim and Therap Med.* 2016.11: 1031-1038.
10. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2: 12.
11. Grumann D, Nubel U, Broker BM. *Staphylococcus aureus* toxins—Their functions and genetics. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 21: 583–592.
12. Price LB, Liu CM, Melendez JH et al. Community analysis of chronic wound

- bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. *PLoS ONE*. 2009; 4 (7),6462.
13. James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneratio*.2008; 16 (1): 37– 44.
  14. Wolcott RD, Ehrlich GD. Biofilms and chronic infections. *J. AmericMed Assoc*.2008: 299(22): 2682–2684.
  15. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PO, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16 (1):2–10.
  16. Mah TF, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends inMicrobiol*. 2001; 9(1): 34–39.
  17. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Panorama do município de Botucatu, SP [Acesso em 10 nov 2018]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/botucatu/panorama>.
  18. Konemann EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: *Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido*. 5th ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
  19. Cunha MLS, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(8):855-60.
  20. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9):3332-8.
  21. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*.1998; 36(3): 618–23.
  22. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2240-4.
  23. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2155-61.
  24. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3374-7.

25. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2151-6
26. Rohde H., Burandt EC., Sienssem N., Frommelt L., Burdesk C. Wurster S., Scherp S., Davies AP., Harris LG., Horstikotte MA., Knobloch JK., Raganath C. Kaplan J., Mack D. (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**:1711–20.
27. Marconi C, Cunha MLRS, Araújo JP, Rugolo LMSS. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus* spp. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 2004;11(2):117-128
28. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RA, Araújo JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz J Micr.* 2006; 37: 64-69
29. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of 61 genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):426-30
30. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):594-600
31. Koning S, van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen J, et al. Severity of nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Panton-Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid pSK41. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3017-21
32. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5113-20.
33. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7687-92.
34. Bhatta DR, Cavaco LM, Nath G, Kumar K, Gaur A, Gokhale S, et al. Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):199. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1531-1>

35. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog.* 2011, 1-13.
36. Oliveira, A; Pereira, VC; Pinheiro, L; Riboli, DFM; Martins, KB; Cunha, MLRS. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative staphylococci. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1423, 2016
37. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iran Biomed J.* 2016;20(3):175–81
38. Satorres SE, Alcaráz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Central european journal of public health.* 2007;15(2):87–90.
39. Szczuka E, Urbanska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia microbiológica.* 2012; 58: 47-52.
40. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322: 207-28.
41. McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(12):1551-1571.
42. Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HA, et al. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun.* 1999;67(2):1004-8.
43. Kocsis E, Lagler H, Pesti N, Stich K, Kristóf K, Nagy K, et al. Comparison of Austrian, Hungarian and Macedonian methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains in relation to prevalence of cytotoxin genes. *Microb Pathog* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Jan 17];46(6):328–36. Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366626>.
44. Waryah CB, Gogoi-tiwari J, Wells K, Eto KY, Masoumi E, Costantino P, et al. Diversity of Virulence Factors Associated with West Australian Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates of Human Origin. 2016;2016.
45. Bonesso MF, Yeh AJ, Villaruz AE, Joo HS, Mccausland J, Fortaleza CMCB, Cavalcante RS, Sobrinho MT, Ronchi CF, Cheung GYC, Cunha, MLRS, Otto, M. Key Role of  $\alpha$ -Toxin in Fatal Pneumonia Caused by Sequence Type 398. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 193, p. 217-220, 2016.

46. Djahmi, N.; Messad, N.; Nedjai, S.; Moussaoui, A.; Mazouz, D.; Richard, J.L.; Sotto, A.; Lavigne, J.P. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin. Microb. Infect.* 2013, 19, E398–E404.
47. Dunyach-Remy, C.; Courtais-Coulon, C.; DeMattei, C.; Jourdan, N.; Schuldiner, S.; Sultan, A.; Carrière, C.; Alonso, S.; Sotto, A.; Lavigne, J.P. Link between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and infected diabetic foot ulcers. Unpublished work, 2016.
48. Bonesso MF, Marques SA, Camargo CH, Fortaleza CMCB, Cunha MLRS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non-outbreak skin infections. *Braz J Microbiol.* 2014;45:1401–7.
49. Abraão, LM. Carreamento nasal/oral de *Staphylococcus aureus* em populações indígenas do norte e sudeste do Brasil: resistência antimicrobiana, virulência, fatores de risco e epidemiologia molecular. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2017.
50. Souza, CSM. Determinação da relação clonal e virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes vivendo com HIV/AIDS e seus familiares. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, 2018.
51. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of panton–valentine leukocidin. *Lab Invest.* 2007;87(1):3–9. doi:10.1038/labinvest.3700501.
52. Souza CSM, Fortaleza CMCB, Witzel CL, Silveira M, Bonesso MF, Marques AS, Cunha MLRS. Toxigenic profile of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated from special groups. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15: 9. DOI 10.1186/s12941-016-0125-5
53. Lim KT, Yeo CC, Suhaili Z, Thong KL. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Terengganu, Malaysia. *J Infect Dis.* 2012;65:502–9.
54. Post, V.; Wahl, P.; Uçkay, I.; Ochsner, P.; Zimmerli, W.; Corvec, S.; Loiez, C.; Richards, R.G.; Moriarty, F. Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014, 304, 565–576.
55. Pereira-Franchi EP, Barreira MRN, da Costa NSLM, Fortaleza CMCB, Cunha MLRS. Prevalence of and risk factor associated with the presence of *Staphylococcus aureus* in the chronic wounds of patients treated in primary health care settings in Brazil. *Ver Soc Bras Med Trop* 2017; 50(6): 833-838.
56. Pires FV, Cunha MLRS, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CMCB. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. *PLoS One.* 2014;9:925-37.

57. Smith TC, Pearson N. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:327–339.
58. Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, Barbian KD, McCarthy AJ, Street C, Hirschberg DL, et al. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *MBio* 2012;3:3.

## Conclusões

- A prevalência de colonização por MRSA foi maior em indivíduos diabéticos quando comparada à população saudável;
- Foram encontrados isolados de *S. aureus* e MRSA colonizando exclusivamente a garganta, fato que indica a importância da inclusão desse sítio de coleta em estudos de prevalência de carreamento desse microrganismo;
- Alguns isolados de MRSA apresentaram sensibilidade à oxacilina e cefoxitina;
- Prevalência de SCCmec tipo IV entre os MRSA isolados de diabéticos;
- Elevado potencial patogênico de MSSA e MRSA ressalta a importância dos MSSA em relação à gravidade das infecções.
- Nenhum *S. aureus* apresentou resistência à vancomicina, linezolida e quinupristina/dalfopristina.
- Clusters de MRSA e MSSA entre isolados provenientes de indivíduos diferentes sugere disseminação entre os diabéticos;
- A maioria dos MRSA foi tipada como ST5-SCCmecTipo IV e ST8-SCCmec Tipo IV.
- Importante linhagem patogênica ST398 foi tipada entre MRSA e MSSA;
- Alguns indivíduos eram colonizados na mucosa nasal e orofaríngea com diferentes cepas de *S. aureus*;
- A idade e doença pulmonar foram associados negativamente ao carreamento de *S. aureus* em indivíduos diabéticos insulino-dependentes;
- Apenas úlcera de membros inferiores foi associada como fator de risco para colonização por *S. aureus*;
- O sexo masculino foi associado como fator de risco para carreamento de MRSA.

## Anexo I

### Calculo amostral

No município de Botucatu, a Secretaria Municipal da Saúde (SMS) possui 1.631 diabéticos insulina-dependentes cadastrados para recebimento de aparelhos glicosímetros. Esta foi a população de base para nosso estudo.

Foi selecionada amostra representativa, baseada nos seguintes parâmetros:

- População total: 1.631.
- Estimativa de carregamento de *S. aureus* (p): 50% (valor sugerido para proporção desconhecida).
- Margem de erro (d): 5%.
- Efeito de desenho (DEFF): 1.

A partir desses valores, utilizando a fórmula  $n = [DEFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z_{1-\alpha/2}^2 * (N-1) + p*(1-p)]$ , obtivemos amostra sugerida de 312 sujeitos.

## Anexo II

Tabela 3. Caracterização da população de diabéticos insulino-dependentes incluídas no estudo.

Indivíduo	Sexo	Idade	Renda familiar (SM)	Comorbidades	Trauma	Tatuagem	Úlcera de MMII	Internação*	Uso de antimicrobiano*	Cirurgia*	Neuropatia	DVP	Atendimento médico	Colonização
5	M	70	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
10	F	82	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
16	F	73	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
19	M	67	3	Doença cardíaca, pulmonar e Neoplasias sólidas	-	-	+	-	-	-	+	+	Ambulatório UNESP	Negativo
22	F	42	1	Doença hepática	+	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
26	M	83	3	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
29	F	64	5	Doença renal	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
35	F	61	5	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
49	M	74	5	Doença pulmonar	-	-	-	-	+	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
52	M	71	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
65	M	78	3	Doença cardíaca	-	-	-	+	+	+	+	-	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
66	F	66	5	Doença cardíaca	-	-	-	+	+	+	+	-	UBS - CECAP	Negativo
69	F	69	5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - CECAP	Negativo
72	M	27	3	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Particular	MRSA
76	F	43	1	Doença SNC	+	-	-	+	+	-	-	-	UBS - Santa Maria	Negativo
80	M	66	1	Doença de SNC e neoplasia sólida	+	-	-	-	-	-	-	+	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
87	F	76	1	-	-	-	+	-	+	-	+	-	UBS - Cohab I	Negativo

90	M	69	1	Doença hepática	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
98	M	61	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
103	F	88	3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	CSI	Negativo
108	F	85	5	Doença cardíaca	-	-	-	+	+	+	-	+	+	UBS - Vila jardim	MRSA
109	F	40	5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
113	F	40	1	Doença hepática	-	-	+	-	-	-	+	+	+	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
122	F	54	1	Doença cardíaca	-	+	-	-	-	-	+	-	-	UBS - Marajoara	Negativo
125	F	73	5	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
127	F	55	3	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
130	F	74	1	Doença do SNC	-	-	-	+	-	-	+	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
134	F	80	3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
140	M	66	3	Doença renal e SNC	+	-	-	-	+	-	+	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
153	F	61	3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	UBS - São Lucio	<i>S. aureus</i>
163	M	69	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	UBS - CSE	Negativo
187	F	55	3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	UBS - CSE	Negativo
190	M	50	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
193	M	50	3	Doença cardíaca, pulmonar e hepática	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Iolanda	Negativo
194	M	54	3	Doença pulmonar e renal	-	-	+	-	-	-	+	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
195	M	53	3	Doença SNC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
202	F	91	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
207	M	61	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	UBS - São Lucio	Negativo
218	M	72	5	Doença cardíaca e renal	-	-	-	-	+	+	-	-	-	Particular	Negativo

228	F	70	3	Neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
236	M	75	5	Doença pulmonar, renal e SNC	-	+	-	-	-	+	-	-	Particular	Negativo
244	M	65	5	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CECAP	Negativo
248	F	49	1	Doença pulmonar e neoplasia sólida	-	-	+	-	-	-	+	-	UBS - Marajoara	<i>S. aureus</i>
252	M	64	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Particular	Negativo
253	F	47	1	Doença hepática	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Real Park	Negativo
255	M	25	3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
272	F	64	1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	Negativo
275	M	62	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - Rubião Jr	Negativo
283	F	62	1	Doença pulmonar	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Real Park	Negativo
289	F	47	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Real Park	Negativo
290	F	93	1	Neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
293	F	78	5	-	+	-	-	-	-	+	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
299	M	67	5	Doença pulmonar	-	-	-	-	+	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
305	F	36	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Iolanda	Negativo
306	F	34	1	Doença renal, hepática e neoplasia sólida	-	-	+	-	-	-	+	+	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
311	M	70	1	-	-	+	-	-	+	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
312	F	40	1	Doença renal, hepática	-	+	-	-	+	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
327	M	82	5	Doença do SNC	-	-	-	-	+	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
329	M	53	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Aeroporto	Negativo

332	M	46	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
341	F	61	1	Doença hepática	-	-	-	-	+	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
343	M	60	1	Doença cardíaca	-	-	-	+	-	-	+	-	UBS - CECAP	Negativo
356	F	53	1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	Ambulatório UNESP	Negativo
364	M	67	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	<i>S. aureus</i>
368	M	51	3	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Iolanda	Negativo
389	F	70	5	Neoplasia sólida	-	-	-	+	-	-	-	-	Particular	Negativo
393	F	59	3	-	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
397	M	20	1	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
406	F	71	1	Doença pulmonar	-	-	-	-	-	-	+	+	Ambulatório UNESP	Negativo
407	M	70	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	+	+	Ambulatório UNESP	Negativo
410	M	65	3	Doença cardíaca e renal	-	-	-	-	-	+	+	-	Ambulatório UNESP	Negativo
412	F	58	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
421	F	69	5	Doença cardíaca e renal	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Cristina	<i>S. aureus</i>
445	F	78	3	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
449	F	62	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Particular	Negativo
456	M	75	5	Neoplasia sólida	-	-	-	+	+	-	+	-	Particular	Negativo
461	F	54	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Santa Elisa	Negativo
465	M	69	3	Doença cardíaca e pulmonar	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
482	F	60	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo

498	F	45	3	Doença cardíaca e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
504	F	62	1	Neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Real Park	<i>S. aureus</i>
506	M	53	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
508	F	63	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
518	M	56	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
521	M	85	3	Doença cardíaca e renal	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
534	M	78	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
535	F	69	3	Doença cardíaca, renal, SNC e neoplasia sólida	-	-	-	-	+	-	+	-	Ambulatório UNESP	Negativo
539	M	52	3	Doença cardíaca	-	-	+	-	-	+	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
543	F	66	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Real Park	<i>S. aureus</i>
544	F	57	1	Doença cardíaca e renal	+	-	-	-	-	+	+	+	Particular	Negativo
551	F	53	3	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - São Lucio	Negativo
552	M	57	5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	Particular	MRSA
553	F	72	3	Doença cardíaca e SNC	-	-	-	-	+	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
554	F	56	3	Doença do SNC e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	MRSA
555	M	58	5	Doença renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	+	+	-	-	UBS - Vila jardim	MRSA
556	F	50	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
557	F	44	3	Doença renal	-	-	-	-	+	-	+	-	Particular	Negativo
558	F	50	1	Doença renal e SNC	+	-	+	-	+	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
559	F	60	3	Doença hepática	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
560	F	69	3	Doença cardíaca e neoplasia sólida	-	-	+	-	-	-	+	-	UBS - São Lucio	<i>S. aureus</i>

561	F	76	1	Doença cardíaca	-	-	-	+	-	+	+	-	UBS - CECAP	Negativo
567	M	56	3	Doença cardíaca e SNC	-	-	-	+	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
568	F	75	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
569	M	68	1	Doença cardíaca, pulmonar, renal	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
570	F	79	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
571	F	61	1	Doença cardíaca, renal e SNC	-	+	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
572	M	67	5	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
573	F	38	3	Doença pulmonar, renal e hepática	-	-	-	+	+	+	+	-	Particular	Negativo
574	F	62	3	Doença pulmonar	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
575	M	65	5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
576	M	51	3	Doença hepática	-	-	-	+	+	-	-	-	UBS - Vila jardim	<i>S. aureus</i>
577	M	58	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
578	F	71	1	Doença cardíaca, renal	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - CECAP	Negativo
579	F	65	5	Doença renal, hepática	+	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
580	F	71	1	Doença renal e hepática	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
581	F	71	3	Doença cardíaca e SNC	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - Vila jardim	Negativo
582	M	77	5	Doença cardíaca, renal e neoplasia sólida	-	-	-	+	-	-	+	-	Particular	Negativo
583	F	66	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	Negativo
584	F	44	3	Doença renal	-	-	+	-	+	+	+	-	UBS - Vila jardim	<i>S. aureus</i>

585	M	69	3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
586	M	63	1	Doença pulmonar, renal, neoplasia sólida	-	-	-	+	+	-	+	-	Particular	Negativo
587	F	56	3	Doença renal e SNC	-	-	-	-	+	-	-	-	UBS - CECAP	Negativo
588	F	39	3	Doença cardíaca, hepática	-	-	-	+	-	-	+	-	UBS - CECAP	Negativo
589	M	45	5	Doença cardíaca, renal, hepática, SNC	-	-	-	+	+	+	-	-	UBS - CECAP	Negativo
590	M	24	5	-	-	+	-	-	+	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
591	M	50	3	-	-	-	-	+	-	+	+	-	UBS - CSE	Negativo
592	F	69	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
593	M	59	3	Doença hepática	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
594	M	69	5	Doença pulmonar, renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
595	M	75	5	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
596	M	69	5	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
597	F	59	1	Doença pulmonar e SNC	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	Negativo
598	M	49	3	-	-	-	-	+	+	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
599	M	57	3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	Negativo
600	F	39	1	Doença cardíaca	+	-	-	-	-	+	-	-	UBS - Jardim Iolanda	Negativo
601	F	55	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
602	M	81	3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	<i>S. aureus</i>
603	F	75	1	Doença renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo

604	F	63	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	<i>S. aureus</i>
605	F	62	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	Negativo
606	F	42	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Aeroporto	<i>S. aureus</i>
607	F	48	1	Doença cardíaca, pulmonar, renal e AIDS	-	-	-	-	+	-	+	+	UBS - Santa Elisa	Negativo
608	F	53	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
609	F	69	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - Santa Elisa	Negativo
610	M	63	1	Doença pulmonar	-	-	-	+	-	-	+	-	Particular	Negativo
611	M	67	1	Doença pulmonar	-	-	-	+	+	-	-	-	UBS - Santa Elisa	Negativo
612	F	59	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Santa Elisa	<i>S. aureus</i>
613	F	63	3	Doença renal e SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Peabiru	<i>S. aureus</i>
614	M		1	Doença cardíaca, pulmonar, renal, hepática	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
615	M	66	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Aeroporto	MRSA
616	M	74	1	Doença do SNC	-	-	-	+	-	+	+	-	Particular	Negativo
617	M	72	3	Doença renal e SNC	-	-	-	+	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
618	M	58	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
619	F	61	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
620	F	67	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
621	F	66	3	Doença renal e hepática	-	-	-	-	+	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
622	M	66	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Santa Maria	Negativo

623	M	13	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
624	F	57	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
625	F	71	1	Doença cardíaca, renal, SNC e neoplasia sólida	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
626	F	46	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Santa Maria	Negativo
627	F	64	1	Doença do SNC	-	-	+	+	-	+	-	-	-	UBS - Rubião Jr	<i>S. aureus</i>
628	F	67	3	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
629	F	81	1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	Particular	Negativo
630	F	62	3	Doença renal, SNC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
631	F	80	3	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
632	F	61	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
633	M	50	1	Doença renal e SNC	-	-	+	-	-	+	+	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
634	F	60	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	UBS - Jardim Aeroporto	<i>S. aureus</i>
635	F	42	3	Doença do SNC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	Particular	Negativo
636	M	66	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Aeroporto	<i>S. aureus</i>
637	F	57	3	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Particular	MRSA
638	F	70	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Particular	Negativo
639	M	73	1	Doença cardíaca, hepática	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Particular	MRSA
640	M	54	3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	UBS - Jardim Aeroporto	<i>S. aureus</i>
641	F	80	1	Doença cardíaca, SNC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	UBS - Jardim Aeroporto	Negativo
642	F	78	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>

643	F	61	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
644	M	57	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
645	M	83	1	Doença renal e SNC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
646	M	70	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
647	M	25	1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
648	M	25	1	Doença pulmonar, renal	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
649	F	75	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
650	M	60	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Jardim Iolanda	Negativo
651	F	69	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
652	F		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
653	M	59	1	Doença cardíaca e renal	-	-	-	+	+	+	+	+	-	Particular	Negativo
654	M	72	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
655	F	60	3	Doença do SNC	-	-	-	+	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
656	F	49	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
657	F	72	3	Doença pulmonar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Particular	Negativo
658	F	31	3	Doença renal	-	-	-	-	+	-	-	+	-	Particular	Negativo
659	M	33	5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Particular	MRSA
660	M	47	3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	UBS - Rubião Jr	<i>S. aureus</i>
661	F	66	3	Doença cardíaca e SNC	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Particular	Negativo
662	M	65	3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Ambulatório UNESP	Negativo
663	F	61	3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		<i>S. aureus</i>
664	F	19	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
665	M	58	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	MRSA
666	F	54	3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Particular	Negativo
667	F	54	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	+	-	-	+	-	Particular	Negativo

668	M	66	3	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
669	M	59	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
670	F	63	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Marajoara	Negativo
671	M	59	1	Doença renal e neoplasia sólida	-	-	-	+	+	+	+	-	Particular	Negativo
672	F	63	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Marajoara	Negativo
673	M	59	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
674	F	59	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
675	F	60	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
676	F	52	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Marajoara	<i>S. aureus</i>
677	F	62	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Marajoara	<i>S. aureus</i>
678	M	66	1	Doença cardíaca, renal e neoplasia sólida	+	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Marajoara	Negativo
679	M	54	1	Doença cardíaca e renal	+	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Marajoara	<i>S. aureus</i>
680	M	42	1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
681	F	62	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
682	F	62	1	Doença renal e hepática	+	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
683	M	39	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
684	M	75	1	Doença cardíaca	-	-	+	-	-	-	+	-	Ambulatório UNESP	Negativo
685	M	70	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
686	F	70	1	Doença pulmonar e renal	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
687	F	22	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
688	M	72	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Jardim Cristina	<i>S. aureus</i>

689	F	68	1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
690	F	75	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
691	F	72	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
692	F	37	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
693	M	76	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	+	UBS - CSE	Negativo
694	F	71	1	Doença cardíaca, pulmonar, renal, hepática e neoplasia sólida	+	-	-	-	-	-	+	+	UBS - CSE	Negativo
695	M	47	1	Doença pulmonar	-	-	+	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
696	M	51	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
697	F	78	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
698	M	66	1	Doença renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - CSE	Negativo
699	F	50	1	Doença renal	+	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	Negativo
700	F	49	1	Doença do SNC	+	-	-	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
701	F	62	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
702	F	73	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
703	F	80	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
704	M	74	1	Doença renal, hepática, SNC e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
705	F	72	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	<i>S. aureus</i>
706	M	83	1	Doença cardíaca, renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
707	M	75	1	Neoplasia solida	+	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
708	M	75	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
709	F	74	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
710	F	74	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
711	F	76	1	Doença cardíaca, renal, SNC e	+	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo

neoplasia sólida														
712	M	73	1	Doença cardíaca, pulmonar e renal	-	-	-	-	+	-	+	+	CSI	Negativo
713	M	51	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		Negativo
714	M	74	1	Doença renal	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
715	F	72	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	<i>S. aureus</i>
716	M	79	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Vila jardim	<i>S. aureus</i>
717	F		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
718	M	62	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - CSE	<i>S. aureus</i>
719	M	61	1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	UBS - Real Park	Negativo
720	M	67	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	UBS - CSE	Negativo
721	F	58	1	Doença hepática e SNC	-	-	-	-	-	-	-	+	Ambulatório UNESP	<i>S. aureus</i>
722	F	68	1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	UBS - CSE	Negativo
723	M	61	1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Particular	Negativo
724	F	71	1	Doença do SNC	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
725	M	65	5	Doença renal e hepática	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
726	M	69	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
727	F	54	5	Doença cardíaca, renal e hepática	-	-	-	+	+	+	+	-	Particular	Negativo
728	F	18	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
729	M	46	3	Doença cardíaca, renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
730	M	84	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	MRSA
731	F	54	5	Doença hepática e SNC	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
732	F	64	3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>

733	F	66	1	Doença cardíaca e neoplasia sólida	-	-	-	+	+	+	-	-	Particular	Negativo
734	M	67	1	AIDS	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambulatório UNESP	Negativo
735	M	19	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i> /MRSA
736	F	80	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Particular	MRSA
737	F	66	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
738	F	69	1	Neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
739	M	68	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
740	M	70	1	-	-	-	-	+	-	-	+	-	Particular	Negativo
741	M	55	3	Doença pulmonar	-	-	-	-	+	+	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
742	M	29	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
743	M	71	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
744	M	39	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Particular	Negativo
745	M	81	5	Doença cardíaca	-	-	-	+	+	+	+	-	Particular	Negativo
746	M	61	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
747	M	18	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
748	M	77	5	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Particular	<i>S. aureus</i>
749	M	70	5	Doença cardíaca, renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
750	M	20	3	Doença pulmonar	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
751	F	74	1	Doença pulmonar, SNC e neoplasia sólida	+	-	+	-	+	-	-	+	Particular	<i>S. aureus</i>
752	M		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo
753	M	78	1	Doença renal	-	-	+	-	-	-	+	+	UBS - Jardim Peabiru	Negativo
754	F	31	1	Doença renal e hepática	-	-	-	-	+	-	+	-	Particular	Negativo
755	F	72	1	Doença cardíaca e	-	-	+	-	-	-	+	+	Particular	Negativo

renal															
756	M	72	1	Doença renal	-	-	-	-	+	-	-	+	Particular	MRSA	
757	M	46	1	-	-	+	-	-	-	-	+	-	Particular	MRSA	
758	F	52	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	<i>S. aureus</i>	
759	F	58	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo	
760	M	62	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Particular	Negativo	
761	M	61	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo
762	M	42	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	<i>S. aureus</i>	
763	F	55	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
764	F	73	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
765	M	68	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
766	M	71	1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
767	F	67	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	<i>S. aureus</i>	
768	F	53	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
769	F	67	1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
770	F	34	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	Negativo	
771	F	86	1	Doença renal	+	-	+	+	+	-	+	+	UBS - Rubião Jr	Negativo	
772	F	74	1	Doença cardíaca, renal, SNC e AIDS	-	-	-	-	-	-	-	-	UBS - Rubião Jr	<i>S. aureus</i>	
773	F	63	1	Doença renal	-	-	-	-	+	-	-	-	Particular	Negativo	
774	F	55	1	Doença renal e neoplasia sólida	-	-	-	-	-	-	+	+	UBS - Marajoara	Negativo	
775	F	76	1	Doença cardíaca	-	-	-	-	-	-	+	+	Particular	Negativo	
776	M	21	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo	
777	F	75	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Particular	Negativo	

**Nota.** Os indivíduos são identificados com números por ordem de coleta. F = feminino; M = masculino; SM= Salário mínimo, a renda familiar está expressa em salários mínimos. \*Internação, Uso de antimicrobiano e cirurgia no ano que precedeu a coleta. Negativo: indivíduo não colonizado por S. aureus e/ou MRSA. SNC=Sistema nervoso central; MMII= membros inferiores; DVP=Doença Vascular Periférica; UBS=Unidade Básica de Saúde em que o indivíduo acompanha o diabetes. Particular = indivíduos que fazem o acompanhamento da doença em clínicas particulares.

**Anexo III****Ficha de levantamento de dados**

Nome: \_\_\_\_\_

Gênero: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_

Local de residência: \_\_\_\_\_ Número de moradores no domicílio: \_\_\_\_

Renda familiar: \_\_\_\_\_

Tipo de Diabetes: ( ) I ( ) II Observação: \_\_\_\_\_

Tempo de diagnóstico do Diabetes: \_\_\_\_ anos.

Tempo de uso de insulina: \_\_\_\_ anos.

Usa hipoglicemiantes orais? Qual(is): \_\_\_\_\_

**Co-morbidades/Charlson score**

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

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

3 - ( ) Doença hepática moderada/severa

6- ( ) AIDS ( ) Tumor sólido metastático

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

Outras co-morbidades:

---



---



---

Tatuagens (S/N): \_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

**Internações no último ano:**

<b>Hospital</b>	<b>Data Entrada</b>	<b>Data Saída</b>	<b>Motivo</b>

**Uso de antimicrobianos no último ano**

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

**Cirurgias e procedimentos invasivos no último ano**

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

**Outras informações de interesse:**


---



---



---

## Anexo IV

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O sr (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada “PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA CARREAMENTO NASAL E OROFARÍNGEO DE *Staphylococcus aureus* EM DIABÉTICOS INSULINA-DEPENDENTES NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP.” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessário.

Várias pessoas carregam no nariz ou na garganta uma bactéria chamada “estafilococo”. Normalmente, essa bactéria não causa nenhum mal. Mas algumas têm um “estafilococo” diferente, que é resistente a vários antibióticos. Essas pessoas têm maior risco de adquirir doenças de pele e outras. O objetivo da nossa pesquisa é saber quais pessoas carregam o “estafilococo”, principalmente em sua forma resistente. Para isso, precisamos colher secreção do seu nariz e garganta e realizar exames. A coleta da secreção se faz colocando uma espécie de “cotonete” em cada narina e na garganta. Na secreção colhida, serão feitos exames para identificar se o “estafilococo” está presente e se ele é da forma resistente. Caso você tenha o “estafilococo” resistente isso não quer dizer que você está doente. Apenas você tem maior risco que os outros de ter doenças. Assim, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, e sua distribuição entre os portadores de diabetes possibilitando medidas de prevenção e tratamento de doenças.

Precisaremos também que você responda a um questionário com informações pessoais, que será aplicado pelo pesquisador. Você levará cerca de 10 minutos para responder a esse questionário.

É importante você saber que em nenhum momento será divulgado seu nome ou qualquer informação a respeito das perguntas que foram feitas que permitam sua identificação (garantimos total sigilo e anonimato das informações coletadas). Além disso, você poderá retirar sua participação da pesquisa a qualquer momento e não será penalizado de qualquer forma por isso, bastando para isso falar com um dos pesquisadores. Quaisquer outras dúvidas podem ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, localizado na Chacárea Butignoli s/n, Rubião Júnior - Botucatu - São Paulo, CEP: 18618-970 (Próximo a FAMESP) fone: 14-3880 1608 ou 1609. O CEP será responsável por guardar todas as informações e garantir a segurança delas. O CEP também irá acompanhar o desenvolvimento do estudo para ver se ele está sendo feito de maneira correta.

**Este documento deve ser assinado em duas vias, uma das quais ficará com você e a outra com os pesquisadores do projeto.**

Declaro que li o texto acima e concordo em participar do projeto de pesquisa.

Ass.: \_\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura da Pesquisadora:

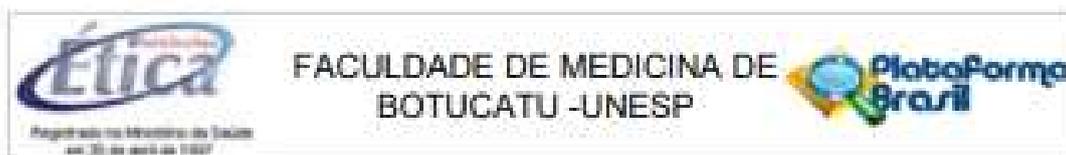
Nathalia Bibiana Teixeira \_\_\_\_\_

**Pesquisadora:** Nathalia Bibiana Teixeira. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3880-0429/ 14 - 99734-3674; na\_tx0402@yahoo.com.br. **Orientadora:** Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3880-0428; cunhamlr@ibb.unesp.br.

Botucatu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

## Anexo V

## Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA CARREAMENTO NASAL E OROFARÍNGEO DE *Staphylococcus aureus* EM DIABÉTICOS INSULINA-DEPENDENTES NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP.

**Pesquisador:** Nathalia Bibiana Teixeira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 44069915.0.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Microbiologia e Imunologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.107.685

**Data da Relatoria:** 15/06/2015

#### Apresentação do Projeto:

Em reunião de 04 de maio de 2015 foi solicitado aos pesquisadores:

1. Informações sobre retenção de amostras para armazenamento e esclarecimentos no TCLE

a) Qual o material que será armazenado?

b) Que as amostras serão armazenadas e se por ventura forem reutilizadas em estudos futuros os participantes da pesquisa serão reconvidados para nova autorização.

O pesquisador atendeu ao que foi solicitado e apresentou TCLE modificado com os devidos esclarecimentos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Constante no parecer 1.045.790

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constante no parecer 1.045.790

**Endereço:** Chácara Batignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

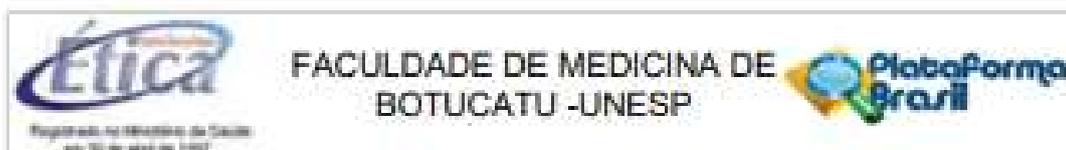
**CEP:** 16.015-070

UF: SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3883-1808

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.197.685

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Constante no parecer 1.045.790

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador atendeu ao que foi solicitado no parecer 1.045.790.

**Recomendações:**

O pesquisador atendeu ao que foi solicitado, possibilitando a aprovação do estudo. Recomendo que a pesquisa tenha início a partir do dia 16/06/2015.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendo a aprovação, sem necessidade de envio a CONEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de Pesquisa aprovado em Reunião Extraordinária do CEP de 15 de junho de 2015, sem necessidade de envio à CONEP.

Recomendo que a pesquisa tenha início a partir do dia 16/06/2015.

Alertamos aos pesquisadores sobre a necessidade de enviar o respectivo "Relatório Final de Atividades" tão logo o presente estudo seja concluído. Essa documentação deve ser enviada via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

BOTUCATU, 15 de Junho de 2015

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
 (Coordenador)

Endereço: Chácara Batagosa, s/n

Bairro: Róssio Junior

CEP: 18.618-070

UF: SP Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3883-1600

E-mail: cep@fmb.unesp.br