

Mariana Fávero Bonesso

**Determinação da Virulência e da Resistência Antimicrobiana em
Staphylococcus spp. Isolados de Pacientes do Serviço de Dermatologia
do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP**

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina
de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do Título de
Mestre em Doenças Tropicais

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

Co-orientador: Dr. Silvio Alencar Marques

Botucatu – São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SELMA MARIA DE JESUS*

Bonesso, Mariana Fávero.

Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP / Mariana Fávero Bonesso. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Silvio Alencar Marques

Capes: 212010

1. Estafilococos. 2. Pele - Doenças. 3. Resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: ECN; fatores de risco; PVL; Resistência a oxacilina; *Staphylococcus aureus*.

Epígrafe

Em meio à dificuldade, encontra-se a oportunidade.

“Albert Einstein”

Dedicatória

Dedicatória

A minha mãe Marcia e ao meu pai Allaymer, pelos grandes exemplos de perseverança e determinação nos estudos, por todo amor, carinho e apoio sem os quais jamais teria conseguido chegar até aqui. Definir em palavras toda minha gratidão é diminuir o verdadeiro significado e valor de vocês para mim.

A minha família que me acolheu: avó Lourdinha pela extrema dedicação, cuidado e apoio sempre pronto, tia Estela e Tio Sérgio, pelo apoio, paciência e carinho.

Às meus irmãos Lígia e Babyinho, pelo carinho e bom humor nos momentos de cansaço e desânimo.

À Rodrigo pela paciência e por ter estado presente apoiando a finalização desse trabalho.

Às minhas amigas Ana Paula Lopes e Camila Ribeiro.

Agradecimientos

Agradecimentos

*Ao Deus de minha compreensão pela inspiração nas horas de estíagem mental,
pela força e determinação diante dos desafios ao longo do caminho.*

*Aos meus Pais, Marcia e Alaymer por sempre acreditarem, investirem e
muitas vezes renunciarem a eles mesmos para investir em nós.*

*Aos meus irmãos, Ligia e Ronaldo (Babynho) pela alegria, diversão e
ânimo quando precisei.*

*Ao Rodrigo pelo apoio e compreensão nos últimos momentos da consecução
desse trabalho.*

*Aos meus tios, Sérgio e Estela e à minha avó, Lourdinha por terem me
acolhido com carinho e pela paciência durante meus momentos de crescimento.*

*A Salete, pela grande oportunidade de estagiar e trabalhar no Laboratório
Clínico, degrau importante para conseguir chegar aqui.*

*A todos os funcionários do laboratório clínico pelo companheirismo e boa vontade
com os estagiários, em especial à Mical e Jonas pelos ensinamentos, amizade e valioso
apoio!*

Aos residentes, professores e funcionários da Triagem da Dermatologia pela paciência, auxílio, companheirismo e amizade durante o período de coleta (2008-2009).

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Patrícia, Eliane, Valéria, Aline, Patrícia Sanchez, Faíse, Letícia, Marcus, Adriano, Adilson, André, Jackson, Lígia, Danilo, Carlos e Cláudia, por contribuírem direta ou indiretamente.

À minha orientadora, Maria de Lourdes investir em mim, acreditar no meu potencial e por ter me dado essa chance de realizar o sonho de trabalhar em sua equipe.

À meu co-orientador Sílvio por todo apoio ligado ao nosso trabalho e pela pronta disposição, e por ter nos apoiado em muitos sentidos.

Aos funcionários, professores e alunos do departamento de Microbiologia e Imunologia por todo e qualquer apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro prestado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo fornecimento de auxílio à pesquisa processo 2009/08569-0.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, obrigada pelos esclarecimentos, prontidão, amizade, apoio, solicitude e disponibilidade, vocês são excelentes!

A Selange e Maiara sempre prontas para auxiliar e atender-nos. Obrigada por toda dedicação.

A banca da qualificação, Prof. Dr. Alessandro Mondelli, Prof. Dr. Carlos Magno Fortaleza (titulares) e à Pós-doutoranda Patrícia Faccioli-Martins (suplente) pela dedicação e pelas valiosas correções.

Ao Professor Carlos Magno por todo auxílio prestado e pelas análises estatísticas que muito contribuíram nesse trabalho.

A Gilma e à Valquiria, amigas que me apoiaram e compreenderam esse caminho.

As minhas amigas Adriana Machado, Paulinha Ferrado e Malu Cappi, que torceram por mim!

Sumário

Sumário

Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxiv
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	11
3. Material e Métodos.....	13
3.1 Amostragem.....	13
3.2 Identificação de <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	13
3.3. Extração do ácido nucléico.....	14
3.4 Determinação de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> e ECN resistentes à metilina-oxacilina (MRSA).....	15
3.4.1 Técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina.....	15
3.4.2 Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à metilina.....	16
3.4.2.1 Amplificação do ácido nucléico (PCR)	16
3.5 Detecção dos genes <i>lukS</i> -PV – <i>lukF</i> -PV da leucocidina Panton-Valentine e do gene <i>tst</i> da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	16
3.5.1 Amplificação do ácido nucléico (PCR).....	16
3.6 Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana.....	18
3.7 Determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	18
3.7.1 Classificação de SCC <i>mec</i> em <i>S. aureus</i>	18

3.7.2 Classificação de SCC <i>mec</i> em ECN.....	20
3.8. Visualização dos produtos amplificados.....	20
3.9 Análise Estatística.....	21
3.9.1 Fatores de risco do hospedeiro para aquisição de MRSA.....	21
4. Resultados.....	24
4.1 Amostragem.....	24
4.2 Identificação bioquímica de Estafilococos coagulase-negativa.....	27
4.3 Determinação da resistência à metilina em amostras de <i>S. aureus</i> e ECN.....	28
4.4 Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à metilina.....	31
4.5 Detecção dos genes <i>lukS</i> -PV – <i>lukF</i> -PV da leucocidina Panton-Valentine e do gene <i>tst</i> da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	36
4.6 Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana.....	37
4.7 Determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	39
4.7.1 Classificação de SCC <i>mec</i> em <i>S. aureus</i>	39
4.7.2 Classificação de SCC <i>mec</i> em ECN.....	41
4.8 Análise Estatística.....	43
4.8.1 Fatores de risco do hospedeiro para aquisição de MRSA.....	45
5. Discussão.....	48
6. Conclusões.....	58
7. Referências Bibliográficas.....	60
Anexo A – Questionário	69
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
Anexo C – Aprovação do comitê de ética.....	71

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de infecções de pele.....	24
Figura 2. Paciente com lesão da qual foi isolada <i>S. epidermidis</i>	25
Figura 3. Paciente com osteomielite supurativa por <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Figura 4. Distribuição de espécies de Estafilococos coagulase-negativa isolados de infecções de pele.....	27
Figura 5. Distribuição das espécies de Estafilococos coagulase-negativa segundo material clínico.....	28
Figura 6. Distribuição de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a oxacilina pelo método de difusão em ágar com disco de oxacilina.....	29
Figura 7. Distribuição de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a cefoxitina pelo método de difusão em ágar com disco de cefoxitina.....	30
Figura 8. Total de amostras resistentes a oxacilina e cefoxitina.....	30
Figura 9. Presença do gene <i>mecA</i> nas amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas dos pacientes do Serviço de Dermatologia.....	32
Figura 10. Distribuição do gene <i>mecA</i> nas espécies de Estafilococos coagulase-negativa isoladas.....	34
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose evidenciando amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> positivas poços 1 a 10, 11, 13 e 14, e negativas poços 11, 13 e 16, controle positivo 17 <i>S. aureus</i> ATCC 33591, controle negativo 18 <i>S. aureus</i> ATCC 25923, água 19.....	35
Figura 12. Distribuição do gene da toxina PVL (Leucocidina Panton-Valentine) segundo material clínico.....	36

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose evidenciando a detecção dos genes LukS-PV e LukF-PV (433pb). Colunas 1-5 e 9-12 amostras de <i>S. aureus</i> positivas, 13 água, 14 controle negativo para PVL ATCC 29213, 15 controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 49775 e 19 ladder 100 pb.....	37
Figura 14. Gel de agarose 2% corado com Sybr ® Safe evidenciando produtos amplificados do SCCmec. 1: ladder, 2-8: amostras SCCmec positivas, cepas controle: 9: COL, 10:N315, 11: PER34, 12: AN546, 13: HU25, 14: MW2, 15: água.	40
Figura 15. Distribuição das resistências fenotípicas encontradas nas amostras de <i>S. aureus</i> de acordo com o tipo de cassette.....	41
Figura 16. Resistência a antimicrobianos de acordo com os tipos de SCCmec em ECN.....	43

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mecA</i>	16
Tabela 2. Oligonucleotídeos para detecção dos genes das toxinas estafilocócicas.....	17
Tabela 3. Oligonucleotídeos para a detecção do Cassete Cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (<i>SCCmec</i>) em <i>S. aureus</i>	19
Tabela 4. Oligonucleotídeos para a detecção do Cassete Cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (<i>SCCmec</i>) em ECN.....	20
Tabela 5. Frequência das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de acordo com o tipo de infecção de pele.	26
Tabela 6. Distribuição da resistência a oxacilina e cefoxitina nas amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas.....	31
Tabela 7. Determinação da sensibilidade a oxacilina em espécies de Estafilococos coagulase-negativa por métodos fenotípicos e genotípicos.....	33
Tabela 8. Determinação da sensibilidade a oxacilina e cefoxitina em amostras de <i>S. aureus</i> por métodos genotípicos e fenotípicos.....	35
Tabela 9. Resistência a drogas em amostras de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN)	38
Tabela 10. Resistência a drogas em amostras de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN)	39
Tabela 11. Frequência de cassetes cromossômicos encontrados em <i>S. aureus</i>	39
Tabela 12. Tipos de <i>SCCmec</i> encontrados em ECN.....	41
Tabela 13. Relação das espécies de Estafilococos coagulase-negativa, os tipos de cassetes encontrados e os respectivos perfis de susceptibilidade encontrados.....	42

Tabela 14. Comparação da presença do gene <i>mecA</i> com métodos fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina e cefoxitina por difusão de disco.....	44
Tabela 15. Relação do tipo de SCC <i>mec</i> , amostras PVL positiva e a Faixa Etária da população estudada.....	44
Tabela 16. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco para aquisição de MRSA.....	46

Resumo



Resumo

Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (MRSA) emergiram logo após a introdução desse fármaco para tratamento de infecções hospitalares. A emergência da resistência a meticilina em cepas de *Staphylococcus aureus* na comunidade (CA-MRSA) instiga a pesquisa de novos tratamentos e dos mecanismos de virulência relacionados a essas cepas. Indivíduos que não apresentavam fatores de risco tradicionais para aquisição de MRSA eram gravemente afetados por cepas de CA-MRSA que geralmente apresentam-se mais virulentas. O objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência de *Staphylococcus* spp. e os fatores de risco para aquisição de MRSA como causa de infecções de pele e/ou de tecidos moles. Durante o período de estudo foram atendidos 127 pacientes com diagnóstico de infecções agudas de pele, sendo que 19 (14,9%) pacientes apresentaram cultura bacteriológica negativa e 108 (85,1%) apresentaram cultura positiva para *Staphylococcus* spp., isolando-se 116 amostras. Dessas 116 amostras, 66 (56,9%) foram identificadas como *S. aureus* e 50 (43,1%) como Estafilococos coagulase-negativa (ECN). O gene de resistência a meticilina foi detectado em 26 (21%) amostras, sendo sete (26,9%) em *S. aureus* e 19 (73,1%) em ECN. A resistência fenotípica para os discos de cefoxitina e oxacilina foi detectada em seis (85,7%) das amostras de *S. aureus* positivas para o gene *mecA* e, com relação aos ECN, 10 (52,6%) mostraram-se resistentes à oxacilina e somente cinco (26,3%) amostras mostraram-se resistentes para o disco de cefoxitina. Das 7 amostras de *S. aureus* positivas para o gene *mecA* 1 (14,2%) foi do tipo Ia, 3 (42,9%) do tipo II e 3 (42,9%) do tipo IV. Para os ECN foram encontrados 2 (10,5%) do tipo I e II cada, 3 (15,8%) do tipo III, 5 (26,4%) do tipo IV e 7 (36,8%) não foram tipáveis. O gene da PVL foi detectado em 15,1% das amostras de *S. aureus*. Os fatores de risco encontrados para aquisição de MRSA nesse estudo foram a utilização prévia de ciprofloxacina [8,75

(1,59 – 48,29) $p=0,01$] e ser trabalhador da área de saúde [OR: 17,5 (1,22 – 250,36) $p=0,04$].

Abstract



Abstract

The emergency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in the community (CA-MRSA), lead to the search of new options of treatment and the virulence factors regarded to them. Individuals without the traditional risk factors for acquisition of MRSA were severely affected CA-MRSA strains, usually more virulent than health-care associated strains (HA-MRSA). The aim of this work was determinate the *Staphylococcus* spp. occurrence and the risk factors for MRSA acquisition as the main cause of skin and soft tissue infections. During the study period 127 patients were attended and diagnosed as acute skin infections, and 19 (14.9%) of the patients had negative bacterial culture and 108 (85.1%) had positive culture for *Staphylococcus* spp. and from that 116 samples were recovered. From these 116 samples, 66 (56.9%) were *S. aureus* and 50 (43.1%) were CoNS (coagulase-negative *Staphylococcus*). The methicillin resistance gene *mecA* was detected in 26 (21%) from the strains where 7 (26.9%) were *S. aureus* and 19 (73.1%) were CoNS. The phenotypic resistance for the cefoxitin and oxacillin discs was detected in 6 (85.7%) of *S. aureus* samples and, regarded to the CoNS samples 10 (52.6%) were resistant to the oxacillin disc and just 5 (26.3%) samples were resistant for the cefoxitin disk. From 7 *S. aureus* samples *mecA* positive 1 (14.2%) was type Ia, 3 (42.9%) type II and 3 (42.9%) type IV. For the CoNS isolated, 2 (10.5%) were tipe I and II for each one, 3 (15.8%) type III, 5 (26.4%) type IV and 7 (36.8%) were not able to type. The PVL gene was detected in 10 (15.1%) on *S. aureus* samples. The risk factors attributed to the MRSA acquisition on this study were the previous ciprofloxacin intake [OR: 8.75 (1.59 – 48.29) p= 0.01] and work in the health care settings [OR: 17.5 (1.22 – 250.36) p= 0.04].

Introdução

1 - Introdução

Staphylococcus é uma bactéria pertencente à família Staphylococcaceae e ao gênero *Staphylococcus* atualmente com 45 espécies¹⁸ existentes onde, 17 podem ser isoladas de amostras humanas. O representante mais importante do gênero, *Staphylococcus aureus*, pode ser encontrado em indivíduos saudáveis e também em imunocomprometidos.⁶⁹

As espécies de *Staphylococcus* spp. são classificadas de acordo com a síntese da enzima coagulase, sendo os coagulase positivos representados pelas espécies *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* subespécie *coagulans*, *S. lutrae* e *S. delphini*. A ausência da síntese da enzima caracteriza o grupo dos coagulase negativos representados principalmente pelas espécies *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. caprae* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.^{2, 36, 41}

Os seres humanos constituem-se no principal reservatório de *S. aureus* estando distribuído em várias partes do corpo como a pele, garganta, intestino e fossas nasais sem provocar danos no hospedeiro. Em hospitais o portador assintomático pode disseminar *S. aureus* trazendo riscos a pacientes imunocomprometidos.⁶⁹ Por serem ubíquos podem causar diversos tipos de infecções como: pneumonia necrosante, infecções de pele e tecidos moles, bacteremia⁹, bem como intoxicações alimentares através da produção de enterotoxinas.^{13, 29, 69, 71}

Estafilococos Coagulase-Negativos (ECN) compõe a microbiota da pele, com relação benigna com o hospedeiro, atuando como comensal ou saprófita. Assim, são considerados patógenos oportunistas de pacientes imunocomprometidos ou submetidos a procedimentos invasivos em ambientes hospitalares.^{3, 12} Processos infecciosos

importantes relacionados aos ECN foram relatados nas últimas décadas sendo comumente isolados de hemoculturas de pacientes que passam por processos invasivos como próteses, cateter, transplantes e em crianças prematuras.¹² A presença de ECN em UTI Neonatal é de extrema relevância, uma vez que são considerados agentes importantes na participação de infecções de corrente sanguínea e, a presença de genes de virulência, pode representar também um fator importante no desfecho das infecções.¹⁴ Recém-nascidos apresentam o sistema imunológico em formação e, quando submetidos à procedimentos invasivos e à instalação de dispositivos, ficam vulneráveis à infecções por ECN.¹⁴

As espécies de ECN frequentemente relacionados com infecções em humanos são *S. epidermidis* (podendo causar bacteremia, osteomielite, peritonite, infecções de sítios cirúrgicos, infecções devido à instalação de cateter e próteses, endoftalmite, etc.), *S. haemolyticus* (infecção do trato urinário, peritonites, ferimentos, entre outros) e *S. saprophyticus* (infecção urinária e sepse). Especificamente em relação à ocorrência de sepse em hospitais, a espécie *S. epidermidis* foi encontrada como agente etiológico em 80% dos casos.²¹

As infecções causadas por espécies de *Staphylococcus* spp. eram tratadas com a penicilina introduzida em 1940, porém, apenas dois anos após sua introdução surgiram cepas de origem hospitalar produtoras de penicilinase o que as tornaram resistentes à penicilina.⁴⁸ Pouco tempo depois, o mesmo ocorreu com as cepas de origem comunitária tornando necessário o uso de antimicrobianos alternativos para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.⁶³

No final dos anos 1950 na Europa, amostras de *S. aureus* de origem hospitalar e comunitárias apresentavam taxas de resistência à penicilina nos valores de 90% e 70%, respectivamente.⁴⁸ Tal constatação implicou na busca de alternativas e, em 1959 a

adição do ácido 6-aminopenicilânico na molécula da penicilina proporcionou a modificação que conferiu proteção do anel beta-lactâmico à ação da beta-lactamase. A meticilina, penicilina semi-sintética (oxacilina, um fármaco da mesma classe presente no Brasil) provou ser resistente à ação da beta-lactamase. Entretanto, ambas foram eficientes por pouco tempo e, em 1961, surgiram as primeiras cepas resistentes às penicilinas semi-sintéticas. Essas novas cepas emergentes foram denominadas de MRSA (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*), até então exclusivas de ambientes hospitalares.^{37, 48}

Na década de 90 ocorreram os primeiros relatos de infecções por *S. aureus* em indivíduos sem fatores de riscos para a aquisição de MRSA de origem hospitalar (HA-MRSA), daí surgindo a denominação de CA-MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina adquirido na comunidade) para diferenciar de HA-MRSA.⁴⁸ As infecções adquiridas na comunidade são distintas das hospitalares, pois os CA-MRSA possuem resistência somente aos antibióticos beta-lactâmicos além de poder carrear o gene para a síntese da Leucocidina Pantón-Valentine (PVL) responsável pelas infecções de pele.³²

Os critérios para que sejam considerados exemplos de CA-MRSA é acometer pacientes sem relatos de infecções anteriores por MRSA, apresentarem culturas positivas para MRSA nas primeiras 48 horas após admissão no hospital, e não terem sido hospitalizados nos últimos 12 meses, nem admitidos em clínicas de repouso ou asilos e não terem sido submetidos à diálise, cirurgia, cateteres ou qualquer tratamento invasivo prévio.⁶⁸

A transmissão da bactéria se dá por contato direto do indivíduo susceptível com o portador assintomático. Há relatos de disseminação frequente de CA-MRSA entre homossexuais, militares, atletas, usuários de drogas ilícitas injetáveis, prisioneiros, pessoas com a pele e as mucosas comprometidas, hábitos de higiene precários, mastite

pós-parto,⁶⁰ nativos americanos,^{32,71} nativos do Alaska e entre crianças devido ao contato com secreções nasais contaminadas.³²

Tais isolados estão associados a doenças de pele e tecidos moles.⁶² As infecções atingem desde tecidos superficiais até os mais profundos onde penetram através do rompimento das barreiras naturais.⁶⁹ As características da infecção apresentam-se similares às causadas por MSSA (Methicillin Sensitive *S. aureus*).²

Relatos de surtos e de infecções causadas por CA-MRSA estão aumentando mundialmente entre todas as faixas etárias. Vários países relataram sua presença como patógeno emergente como os Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, Samoa, vários países do continente Europeu⁶² e da América do Sul (Brasil, Uruguai e Colômbia).¹ No Brasil há relatos da presença desse patógeno na comunidade implicados na etiologia de infecções como furunculose⁵⁹, infecções metastáticas com grandes complicações¹⁹ e pneumonias^{16, 20}.

Reinert et al⁶¹ analisaram uma coleção de cultura obtida entre 1995 e 1999 e caracterizaram-nas por PFGE (Pulsed Field Gel Electroforesis). Os resultados mostraram que o perfil predominante (80%) correspondia ao clone endêmico brasileiro (BEC). Três, das 50 amostras selecionadas, carregaram o cassete do tipo IVc e os resultados do MLST (Multi Locus Sequence Typing) mostraram que eram diferentes umas das outras: ST3, ST5 e ST88. Tais dados revelam que a presença do SCCmec IV no Brasil é antiga e deve ter passado despercebida na prática clínica e laboratorial. Faz-se necessário detectar e monitorar essas cepas na comunidade e no hospital para melhor entendimento da epidemiologia e controle de disseminação⁶¹.

Fatores de risco de aquisição de CA-MRSA devem ser avaliados devido à ampla disseminação. Em locais de grande proximidade entre os indivíduos há maior risco de infecções por *S. aureus*. Estudos realizados com pessoas que mantêm contatos

próximos demonstram que a higiene é um fator importante na aquisição de *S. aureus*.⁷⁶ Os objetos de uso comum (sabão e sabonetes) e o ambiente estão relacionados aos surtos de infecções por esse patógeno.⁷⁶ Há relatos de transmissão entre humanos e animais e vice-versa⁶⁵, de cepas patogênicas multirresistentes de CA-MRSA que podem carrear os genes para produção da toxina Leucocidina Panton-Valentine (PVL).⁷⁷

Cepas de CA-MRSA isoladas de crianças apresentam maior susceptibilidade a antimicrobianos não beta-lactâmicos em comparação às isoladas de adultos.¹⁵ Isso se deve aos hábitos e aos diferentes ambientes que frequentam além de que, os agentes antimicrobianos utilizados em crianças podem diferir daqueles ministrados a adultos, proporcionando assim diferente pressão seletiva na comunidade. Entre os adultos, a resistência do CA-MRSA à gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina é mais frequente do que observado nos isolados infantis.¹⁵

Em decorrência dessas observações iniciaram-se estudos genéticos e moleculares responsáveis pela resistência dos microrganismos aos antibióticos e a identificação que cepas de MRSA adquiriram e integraram em seu genoma o elemento móvel que possui os genes de resistência, chamados de *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). No SCC*mec* está presente o gene responsável pela resistência à metilina (*mecA*) e demais beta-lactâmicos, e os genes que determinam a resistência à outras classes de antibióticos. As cepas relacionadas às infecções comunitárias contêm o elemento móvel pequeno e mais leve, o SCC*mec* IV ou V (de 21 a 25 kb) e são resistentes, geralmente, somente aos antibióticos beta-lactâmicos.⁸⁰ As cepas de HA-MRSA carregam os elementos móveis mais pesados (SCC*mec* I a III) pois possuem genes que codificam resistências a antibióticos de várias classes.⁵⁵

O elemento móvel SCC*mec* é caracterizado pela presença de elementos genéticos essenciais: o complexo *mec* (classes A a E), o complexo *ccr*,²² regiões

Jukyards (J)⁸² e na extremidade 3' está ligado o *open reading frame (ORF)*, *orfX*. O *SCCmec* é integrado no cromossomo do *Staphylococcus* num sítio específico denominado *attB_{scc}* localizado downstream do *orfX*.⁸¹ Existem vários tipos de *SCCmec* (I a XI)²⁸. Até o presente momento o complexo *ccr* possui oito tipos diferentes, sendo cinco alótipos diferentes para o *ccrA* (*ccrA1* a *ccrA5*), para o *ccrB* (*ccrB1* a *ccrB4* e *ccrB6*) e um para o *ccrC1*.²⁸ Os alótipos do complexo *SCCmec* são caracterizados pela presença de determinados genes *ccr*.²⁷ Os genes *ccrA* e *ccrB* codificam as recombinases da família das “invertases/resolvases”. Essas enzimas mediam a integração dentro e fora do cromossomo conferindo a mobilidade do cassete.⁸⁰

As regiões J codificam vários pseudogenes aparentemente sem função para o metabolismo bacteriano⁸⁰ e também contêm genes de resistência mediados, por plasmídeos ou transposons, a antibióticos não beta-lactâmicos e metais pesados.⁸² São caracterizadas em três partes: J1, que é a região entre a extremidade direita e o complexo *ccr*, J2, compreendida entre as regiões *ccr* e *mec* e a J3 que se localiza entre o *mec* e o *orfX*. A região J1 tem sido identificada em *SCCmec* dos tipos II e IV. A presença ou ausência de genes codificadores de resistência na região J3 pode ser usado como marcadores para classificar os elementos *SCCmec*.³³

Os *SCCmec* podem ser encontrados em várias espécies de *Staphylococcus* além de *S. aureus*, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. warneri*.²² A origem do *SCCmec* é desconhecida e não há relatos de outros gêneros diferentes de *Staphylococcus* carrear esse cassete cromossômico. A presença do *SCCmec* do tipo IV em *S. epidermidis* em pessoas saudáveis, sugere ser ele o responsável pela conversão do CA-MSSA para CA-MRSA²¹ onde a transmissão ocorre principalmente pela transdução mediada por bacteriófagos.²⁶

O gene *mecA* codifica a proteína ligadora de penicilina (PBP 2' ou 2a)⁴⁶ presente na superfície da membrana citoplasmática cuja função é sintetizar a parede bacteriana.⁶³ Nas cepas sensíveis as PBP's tradicionais se ligam facilmente aos antibióticos beta-lactâmicos o que impede a correta formação da parede celular. No entanto, a PBP 2a possui baixa afinidade a essa classe de antimicrobianos conferindo a resistência às penicilinas semi-sintéticas.^{25,46}

O gene *mecA* é regulado por dois genes, o *mecI* e o *mecR1* e desempenham funções análogas ao do mecanismo de regulação da síntese de beta-lactamase, o *blaI* e o *blaR1*. O preciso mecanismo de regulação ainda não está totalmente estabelecido, mas essencialmente o gene *blaI* consiste de uma proteína ligadora de DNA que reprime a transcrição do gene da beta-lactamase e *blaR1* codifica uma PBP transdutora de sinal que na presença de antibióticos beta-lactâmicos lidera a transcrição da enzima.⁹

Boyle-Vavra et al⁵ realizaram um estudo com pacientes com infecções de pele e de tecidos moles e outros colonizados por CA-MRSA, com o objetivo de testar a resistência a vários antimicrobianos bem como isolar aquelas que carregavam o gene *mecA*. Os resultados mostram que 94% das cepas recuperadas dessas infecções e 85,3% das cepas que colonizavam os indivíduos saudáveis apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos não beta-lactâmicos. O *SCCmec IV* estava presente em 34% das amostras dos indivíduos que possuíam pelo menos um fator de risco para aquisição de MRSA.⁵

A presença de plasmídeos de resistência a clindamicina em USA 100 e USA 300 sugere a transmissão horizontal desses genes da primeira para a segunda cepa, representando, assim, um grande desafio ao tratamento das infecções adquiridas na comunidade⁴³. A resistência pode ser intrínseca, prontamente detectada em teste de disco-difusão ou pode ser induzida. Em cepas MLSBi positivas (macrolídeo-

lincosamina-estreptogramina B resistentes) um indutor, como a eritromicina por exemplo, promove a produção de metilase pelo gene *emr* e a subsequente metilação da unidade 23S do ribossomo faz com que a cepa expresse a resistência a lincosamina (como a clindamicina). Fenotipicamente as cepas são resistentes à eritromicina e sensíveis à clindamicina, porém quando se dispõem o disco de eritromicina a 16 milímetros do disco da clindamicina a cepa expressa a resistência induzida formando uma zona em D. A presença do gene *mecA* no CA-MRSA não é critério, por si só, para que haja a resistência induzida.⁵⁷

Outros mecanismos de resistência têm sido identificados em cepas que não carregam o gene *mecA* como, por exemplo, a hiperprodução de beta-lactamase responsável pela inativação da oxacilina ou a resistência modificada (MOD-SA) mediada por diferentes tipos de PBP's com afinidades alteradas para este antibiótico. Cepas com esse perfil de resistência são denominadas *borderline*.⁷⁸

Os microrganismos que carregam o SCC*mec* podem abrigar os genes *lukS* e *lukF* que codificam a produção da toxina Leucocidina Panton-Valentine (PVL).⁵⁴ Adicionalmente, podem carrear genes que codificam toxinas responsáveis pela síndrome do choque tóxico (TSS), escarlatina estafilocócica (staphylococcal scarlet fever) (ambas devido à toxina da síndrome do choque tóxico 1 [TSST1] e enterotoxinas estafilocócicas), síndrome da pele escaldada (SSSS, devido à esfoliatinas) e intoxicação alimentar (*se's*, enterotoxinas estafilocócicas).^{69, 29, 30}

As infecções profundas de pele e de tecidos moles, como furúnculos e abscessos cutâneos, além de pneumonia necrosante, são atribuídas à presença da toxina PVL produzida por *S. aureus*. Através da lise das células de defesa, essa toxina promove grave dano tecidual. Dificilmente PVL-positivos são encontrados em ambientes nosocomiais associados à bacteremia.^{36, 44}

A leucocidina foi associada à infecção de pele e de partes moles por dois estudiosos, Panton e Valentine, no ano de 1932. A aquisição dos genes que codificam a PVL é feita através da transdução de um tipo específico de bacteriófago, phiSLT, que lisogeniza uma célula portadora desse gene e a transporta para outra célula. A partir da sua transcrição são produzidas duas exoproteínas, a LukS-PV e a LukF-PV. Quando secretadas, a LukS-PV inicia uma ligação à membrana do leucócito polimorfonuclear (PMN) e são dimerizados com o LukF-PV alternando um e outro até a completa formação do heptâmero. Há a formação de canais de cálcio induzindo a produção das interleucinas e mediadores inflamatórios. Dependendo da concentração da toxina, os PMN's podem sofrer lise ou apoptose. Devido a essas evidências, provavelmente a PVL não esteja diretamente associada à necrose tecidual, mas sim relacionada aos grânulos lisossomais citotóxicos liberados pela lise do PMN, ao oxigênio reativo liberado dos granulócitos ou, ainda, à cascata inflamatória.⁶

A presença de PVL nos pulmões causa hemorragia, extensiva necrose dos septos alveolares, destruição do epitélio que recobre os brônquios e os bronquíolos⁸⁰ e cortes histopatológicos mostram lesões necróticas na mucosa da traquéia.³⁶ Estudos realizados anteriormente propuseram que a propensão do CA-MRSA causar infecções graves de pele e tecidos moles e, eventualmente, pneumonia necrosante, é devido ao gene que codifica a produção de PVL.⁶⁶

A partir dessas evidências os objetivos desse estudo foram avaliar os fatores de risco para aquisição de CA-MRSA, detectar os fatores de virulência TSST-1 e PVL, bem como traçar o perfil de susceptibilidade às drogas e a caracterização do SCC*mec* das amostras de MRSA coletadas de pacientes do serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Objetivos

2. Objetivo Geral

Determinar a ocorrência de *Staphylococcus* spp. e os fatores de risco para aquisição de MRSA como causa de infecções de pele e/ou de tecidos moles em pacientes atendidos no ambulatório e/ou serviço de emergência da Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.

2.1 Objetivos Específicos

- Identificar amostras de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa (ECN) isoladas de infecções de pele e/ou de tecidos moles em pacientes da Dermatologia da FMB.
- Detectar a resistência à oxacilina em *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa pelas técnicas de difusão de disco e da detecção do gene *mecA*.
- Detectar a presença dos genes responsáveis pela síntese da leucocidina Pantovallentine (lukS-PV – lukF-PV) e pela toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) em amostras de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa incluídas no estudo.
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos em amostras de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa incluídas no estudo.
- Caracterizar o SCC*mec* das amostras de MRSA e MRCo-NS (*Staphylococcus* coagulase negativa resistente à meticilina).
- Determinar os fatores de risco para aquisição de MRSA.

Material e Métodos



3. Material e Métodos

3.1 Amostragem

As amostras foram coletadas de pacientes com infecções purulentas de pele e/ou de tecidos moles que procuraram atendimento em ambulatório e/ou serviço de emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, na especialidade da Dermatologia no período de setembro de 2008 a setembro de 2009, totalizando 127 pacientes (amostra de conveniência). As infecções incluídas nesse estudo foram clinicamente diagnosticadas pelo médico responsável como: furúnculos, celulites/ erisipela, abscessos, hidradenites, foliculites, pés diabéticos infeccionados, osteomielites supurativas, infecções secundárias com secreção piogênica, impetigo bolhoso. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo C).

As amostras de secreções foram coletadas com *swab* com meio de transporte Stuart (Loborclin®) estéril por um único pesquisador após entrega do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) para os pacientes que aceitaram participar do estudo e foram enviadas imediatamente para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências. Os pacientes responderam a um questionário com questões para análise epidemiológica dos achados (Anexo A).

3.2 Identificação de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa

Os *swabs* foram semeados em ágar Sangue de Carneiro (5%) para visualização da hemólise das colônias e em Manitol-Sal ágar, meio seletivo para *S. aureus*. As colônias típicas foram coradas pelo método de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as amostras foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O

gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus* com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina (0,04 U) indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm, e pela sensibilidade à furazolidona (100 µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro.¹²

Para diferenciação da espécie *S. aureus* dos ECN foi realizada a prova da coagulase utilizando plasma de coelho em tubo. Essa prova foi realizada adicionando 500µl de cultura da bactéria em *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) em 250µl de plasma de coelho realizando leituras de 1, 4 e 24 horas.¹² Para a identificação das espécies de ECN utilizou-se o método simplificado proposto por Cunha et al¹² conforme esquema de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização de testes de utilização de açúcares (xilose, sacarose, trealose, manitol e maltose), crescimento anaeróbico em meio tioglicolato, redução de nitrato, produção de hemolisinas, urease e ornitina descarboxilase.

As seguintes linhagens de ECN de referência internacional *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xylosus* (ATCC 29979) foram utilizadas para controle dos resultados dos testes.

Posteriormente à confirmação da espécie, conservaram-se as amostras em caldo nutriente com glicerol a -70°C.

3.3. Extração do ácido nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubado a 37° C por 24 h.

A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare®) que consiste na centrifugação do caldo BHI com o inóculo crescido a 37° C por 24 horas, seguida de

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

3.4 Determinação de amostras de *Staphylococcus aureus* e ECN resistentes à metilina-oxacilina (MRSA)

3.4.1 Técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina

A técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados com Oxacilina (1 µg) e Cefoxitina (30 µg) foram utilizados para o teste conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI (2009).¹⁰ Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas com a turbidez da escala 0.5 de McFarland.

A densidade do inóculo uma vez ajustada realizou-se a semeadura através de swab estéril na superfície de ágar Mueller Hinton, e aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI¹⁰. A linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle em todos os experimentos.

3.4.2 Detecção do gene *mecA* de resistência à metilina

3.4.2.1 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

As reações de PCR realizadas em microtubos de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada primer (Tabela 1), 2,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 0,75 µl de MgCl₂ (50mM) e 5 µl de amostra. A incubação realizou-se em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al⁵⁰ que consistiram de: 40 ciclos de desnaturação a 94° C por trinta segundos, anelamento dos primers a 55,5° C por trinta segundos e extensão a 72° C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72° C por cinco minutos antes de resfriar à 4° C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	TPA*
Primer	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGCC	533 bp
	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTGC	

Fonte: Murakami et al⁵⁰ *TPA: Tamanho do Produto Amplificado

3.5 Detecção dos genes *lukS-PV* – *lukF-PV* da leucocidina Panton-Valentine e do gene *tst* da toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em *S. aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativa*

3.5.1 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Após a extração do DNA das amostras (Item 3.3), as reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada primer (Tabela 2), 2,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 0,75 µl de MgCl₂ (50mM) e 5 µl de amostra. A

incubação realizou-se em termociclador apropriado, sendo que a amplificação para detecção dos genes *lukS*-PV – *lukF*-PV consistiu na técnica descrita por Lina et al³⁶, ou seja, 30 ciclos de desnaturação a 94° C por trinta segundos, anelamento dos primers a 55° C por trinta segundos e extensão a 72° C por um minuto. Após completar os 30 ciclos, os tubos foram incubados a 72° C por cinco minutos antes de resfriar à 4° C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 49775) e negativo (*S. aureus* ATCC 29213).

Para a detecção do gene *tst* foram utilizados os parâmetros preconizados por Johnson³⁰ e otimizados por Cunha et al¹³ sendo o primeiro ciclo a 94° C por quatro minutos, desnaturação a 94° C por 2 minutos, anelamento dos primers a 55° C por 2 minutos e extensão a 72° C por um minuto e 30 segundos, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94° C por 2 minutos, anelamento dos primers a 53° C por 2 minutos e extensão a 72° C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo a temperatura de anelamento foi reduzida para 51° C por 2 minutos, seguido por mais 37 ciclos de desnaturação a 94° C por 2 minutos, anelamento dos primers a 51° C por 2 minutos e extensão a 72° C por um minuto e 30 segundos. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72° C por sete minutos antes de resfriar à 4° C.

Tabela 2. Oligonucleotídeos para detecção dos genes das toxinas estafilocócicas

Função	Nome	Seqüência de nucleotídeos 5'a 3'	TPA*
Primer	Luk-PV1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCCA	433pb
	Luk-PV2	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	
Primer	Tsst1	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	350bp
	Tsst2	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	

Fonte: Lina et al³⁶, Johnson et al³⁰, Cunha et al¹³. *TPA: Tamanho do produto amplificado

3.6 Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos Gentamicina 10µg, Linezolida 30µg, Penicilina G 10UI, Sulfametazol/Trimetoprin 25µg, Eritromicina 15µg, Clindamicina 2µg e Vancomicina 30µg, foram avaliados por meio do método de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme critérios recomendados pelo CLSI.¹⁰

Para o preparo dos inóculos utilizaram-se culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas com a turbidez da escala 0.5 de McFarland.

Após homogeneização desta suspensão foi realizada a semeadura em uma placa de ágar Mueller-Hinton sendo os discos dispensados em até 15 minutos após a semeadura. As placas foram incubadas em estufa por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C, aferindo os halos de inibição após este período.

O teste de resistência induzida a clindamicina foi realizado conforme proposto pelo CLSI, dispondo o disco de clindamicina a 16 milímetros do disco de eritromicina no ágar Mueller-Hinton, e a observação do achatamento do halo indicativo de resistência induzida.

3.7 Determinação do tipo de SCCmec

3.7.1 Classificação de SCCmec em *S. aureus*

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando o método de reação PCR-Multiplex com o primers descritos na **Tabela 3**, conforme descrito por Milheiriço et al.⁴⁷ As condições de ciclagem foram 94° C por 4 minutos; 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 53° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 4 minutos.⁴⁷

Como controle para a tipagem do SCCmec foram utilizadas as cepas COL para SCCmec tipo I; N315 para SCCmec tipo IA; PER34 para o SCCmec tipo II; AN546

para o SCC*mec* tipo III; HU25 para o SCC*mec* tipo IIIA e MW2 para o SCC*mec* tipo IV.

Tabela 3. Oligonucleotídeos para a detecção do Cassete Cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em *S. aureus*

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

SCC*mec*/R*: Tipo de SCC*mec*/ Região

TPA**: Tamanho do produto amplificado.

Fonte: Milheiriço et al⁴⁷ e Oliveira e Lencastre⁵⁶.

3.7.2 Classificação de SCCmec em ECN

Para a classificação do SCCmec em ECN foram utilizados os primers (**Tabela 4**) para o locus específicos de cada tipo. As reações foram realizadas em termociclador apropriado empregando os parâmetros descritos por Machado et al (2007)³⁹, que consistem em: 92°C por 3 minutos seguidos por 30 ciclos de 92° C por 1 minuto, 56° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto e 30 segundos.

Tabela 4. Oligonucleotídeos para a detecção do Cassete Cromossômico estafilocócico mec (SCCmec) em ECN

Primer	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	SCCmec/R*	TPA**
CIF2 F2	5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3'	I, região J1	495
CIF2 R2	5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'		
KDP F1	5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3'	II, região J1	284
KDP R1	5' – CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG – 3'		
DCS F2	5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3'	I, II, IV região J3	342
DCS R1	5' – CTAAATCATAGCCATGACCG – 3'		
RIF4 F3	5' – GTGATTGTTTCGAGATATGTGG – 3'	III região J3	414
RIF4 R9	5' – CGCTTTATCTGTATCTATCGC – 3'		

SCCmec/R*: Tipo de SCCmec/ Região amplificada

TPA**: Tamanho do produto amplificado.

Fonte: Milheirão et al⁴⁷, Oliveira e Lencastre⁵⁶ e Machado et al³⁹

3.8. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão TBE 1,0 X e corado com Sybr Safe®. O

tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o marcador de peso molecular de 100 bp e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

3.9 Análise Estatística

Foram calculadas as sensibilidade e especificidade do método de disco-difusão com discos de oxacilina e cefoxitina comparando com a detecção do gene *mecA* (padrão ouro) para a detecção da resistência a meticilina.

Para comparação entre as variáveis categóricas foram realizados testes não-paramétricos para proporção: χ^2 e Teste Exato de Fischer (quando recomendável). Variáveis contínuas foram comparadas através do Teste T de Student. O teste U de Mann-Whitney foi usado para analisar dados numéricos. Variáveis que obtiveram p-valor inferior a 0,1 na análise univariada foram incluídas em modelo multivariado (regressão logística). As análises dos dados obtidos nos questionários foram realizadas nos *softwares* EPI-INFO para Windows®, versão 3.2 (© Centers for Disease Control and Prevention, USA) e SPSS versão 15.0 (© SPSS, inc.). Nível de significância final de 0,05 foi utilizado em todos os testes.

3.9.1 Análise dos Fatores de Risco do Hospedeiro Para Aquisição de MRSA

Fatores de risco individuais para aquisição de MRSA foram abordados através de estudos “caso-controle”. Os “casos” foram selecionados entre os pacientes com culturas positivas para MRSA. Os “não casos” foram selecionados da mesma base populacional com o critério de ausência de culturas positivas para MRSA. Os fatores de risco foram analisados de acordo com os dados epidemiológicos coletados da população em estudo. Os dados do questionário (Anexo A) analisados foram: dados demográficos,

comorbidades, admissão em instituições de saúde, procedimentos médicos, uso de antimicrobianos, prática de esportes, uso de drogas ilícitas e orientação sexual. Todos os dados foram armazenados e analisados no *software* EPI-INFO (versão 3.5.2, Center for Disease Control and Prevention) e no SPSS versão 15.0.

Resultados

4. Resultados

4.1 Amostragem

Foram coletados *swabs* de 127 pacientes que procuraram atendimento dermatológico nos serviços de ambulatório e/ou emergência da Dermatologia no período de setembro de 2008 a setembro de 2009. Detectou-se que 19 (14,9%) pacientes apresentaram cultura bacteriológica negativa para *Staphylococcus* spp. e 108 (85%) apresentaram cultura positiva para *Staphylococcus* spp. isolando-se 116 amostras (Figura 1).

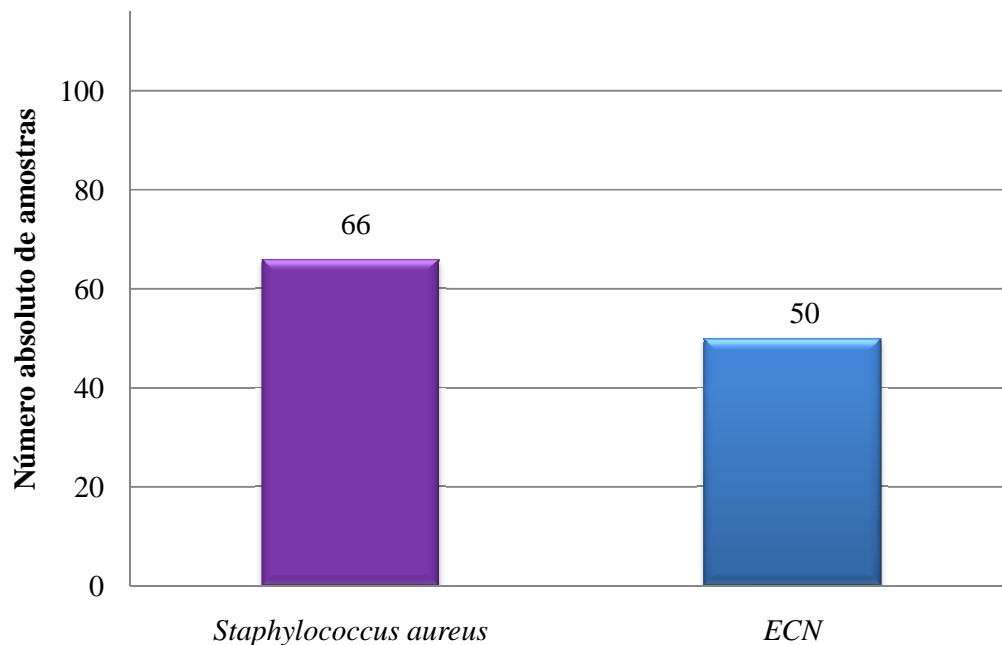


Figura 1. Distribuição de *Staphylococcus* spp. isolados de infecções de pele.

Dentre elas 66 (56,9%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus* sendo 26 (39,4%) de infecções secundárias, 13 (19,7%) de onicocriptose infeccionada, 8 (12,1%) de furunculose, 6 (9,1%) isoladas de impetigo, 4 (6,1%) de pé diabético infeccionado, 3 (4,5%) recuperadas de celulites, 3 (4,5%) de osteomielites, 1 (1,5%) de foliculite, 1 (1,5%) de erisipela e 1 (1,5%) de outro tipo de infecção (Figura 3). Foram

recuperadas 50 (43,1%) amostras identificadas como Estafilococos coagulase-negativa (ECN), 20 (40%) recuperadas de infecção secundária, 6 (12%) de pé diabético infeccionado, 5 (10%) de impetigo, 5 (10%) de furunculose, 4 (8%) de outros tipos de infecções, 4 (8%) de hidradenite, 2 (4%) onicocriptose infeccionada, 2 (4%) de foliculite e 2 (4%) de osteomielite (**Tabela 5, Figura 2**).



Figura 2. Paciente com lesão da qual foi isolada a espécie *S. epidermidis*



Figura 3. Paciente com osteomielite supurativa por *S. aureus*

Tabela 5. Frequência das espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com o tipo de infecção de pele.

Apresentação Clínica	<i>S. aureus</i>		ECN		Negativa para <i>Staphylococcus</i> spp.	
	N	%	N	%	N	%
Celulite	3	4,5	0	0	2	10,5
Erisipela	1	1,5	0	0	1	5,3
Foliculite	1	1,5	2	4	1	5,3
Furunculose	8	12,1	5	10	1	5,3
Hidradenite	0	0	4	8	1	5,3
Impetigo	6	9,1	5	10	0	0
Infecção secundária ¹	26	39,4	20	40	6	31,6
Onicocriptose	13	19,7	2	4	1	5,3
Osteomielite	3	4,5	2	4	1	5,3
Outra ²	1	1,5	4	8	4	21,1
Pé diabético	4	6,1	6	12	1	5,3
Total	66	100	50	100	19	100

Infecção secundária¹: Infecção que se origina na presença de uma porta de entrada existente, durante ou após um tratamento de outra infecção, podendo ocorrer também em decorrência de alterações no sistema imunológico.

Outra²: Tecido necrosado, amigdalite.

4.2 Identificação bioquímica de Estafilococos coagulase-negativa (ECN)

A identificação fenotípica das 50 amostras de ECN (**Figura 4**) caracterizou 24 (48%) como *S. epidermidis*, 7 (14%) *S. haemolyticus*, 6 (12%) *S. saprophyticus*, 3 (6%) *S. xylosum*, 3 (6%) *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, 2 (4%) *S. cohnii* subsp *urealyticus*, 2 (4%) *S. cohnii* subsp *cohnii*, 1 (2%) *S. warneri*, 1 (2%) *S. lugdunensis* e 1 (2%) *S. capitis*.

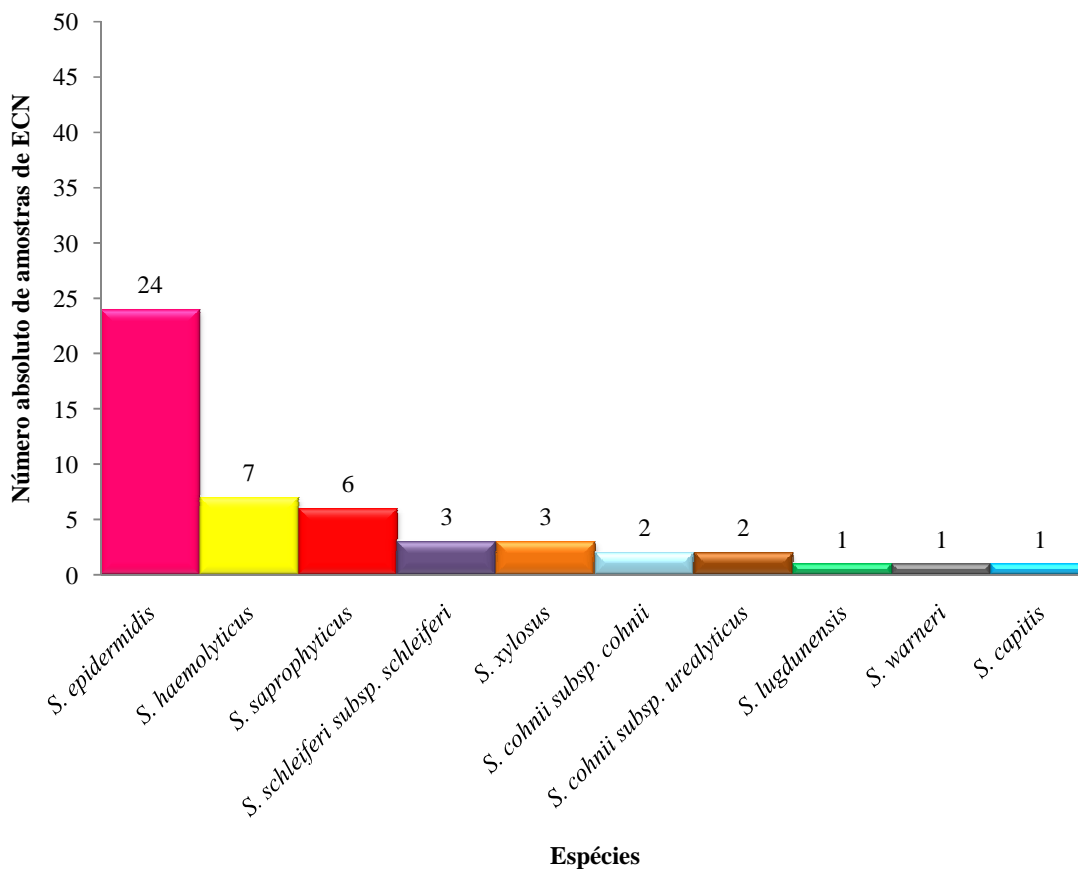


Figura 4. Distribuição de espécies de Estafilococos coagulase-negativa isoladas de infecções de pele.

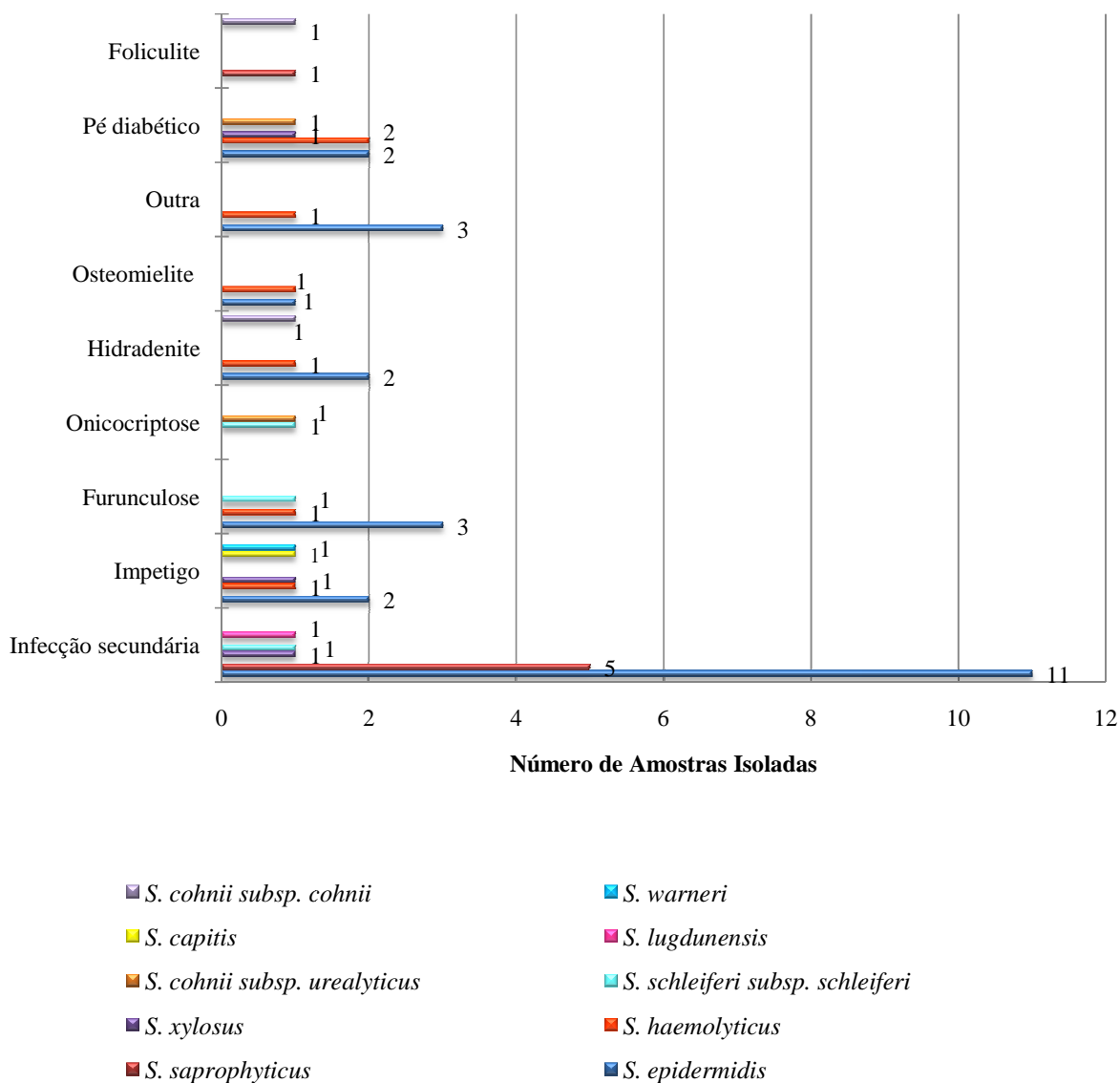


Figura 5. Distribuição das espécies de Estafilococos coagulase-negativa segundo o material clínico.

4.3 Determinação da resistência à meticilina em amostras de *S. aureus* e ECN

A determinação da resistência a meticilina pelo método de disco-difusão revelou 30 (24%) amostras resistentes ao disco de oxacilina e 19 (15%) resistentes a cefoxitina. Dessas 30 (23,8%) amostras resistentes a oxacilina, 9 (30%) eram da espécie *S. aureus*.

Quanto ao disco de cefoxitina, das 19 resistentes, 8 (42%) amostras de *S. aureus* mostraram-se resistentes (**Figura 6**).

Vinte e uma (70%) das amostras resistentes a oxacilina eram ECN. Com relação a sensibilidade a cefoxitina, somente 11 (57,9%) mostraram-se resistentes fenotipicamente (**Figura 7**).

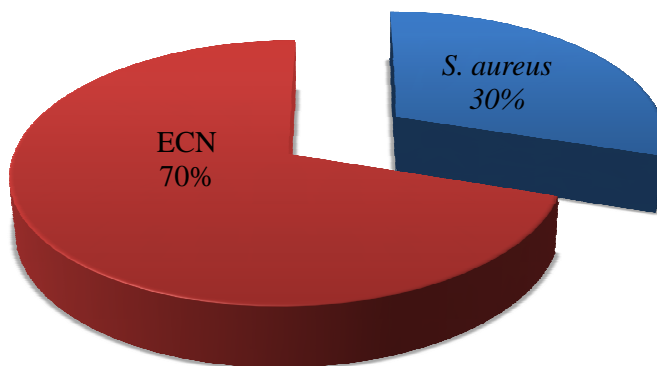


Figura 6. Distribuição de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a oxacilina pelo método de difusão em ágar com disco de oxacilina.

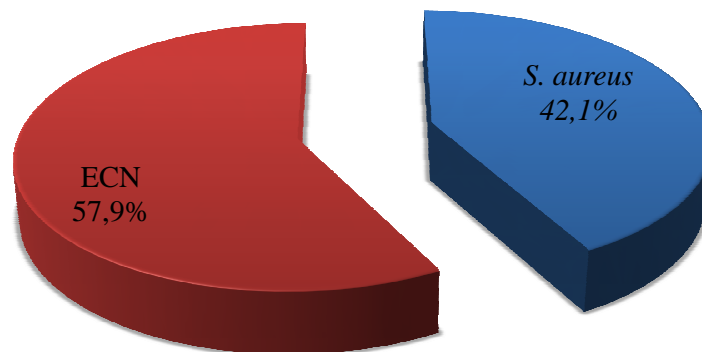


Figura 7. Distribuição de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a cefoxitina pelo método de difusão em ágar com disco de cefoxitina.

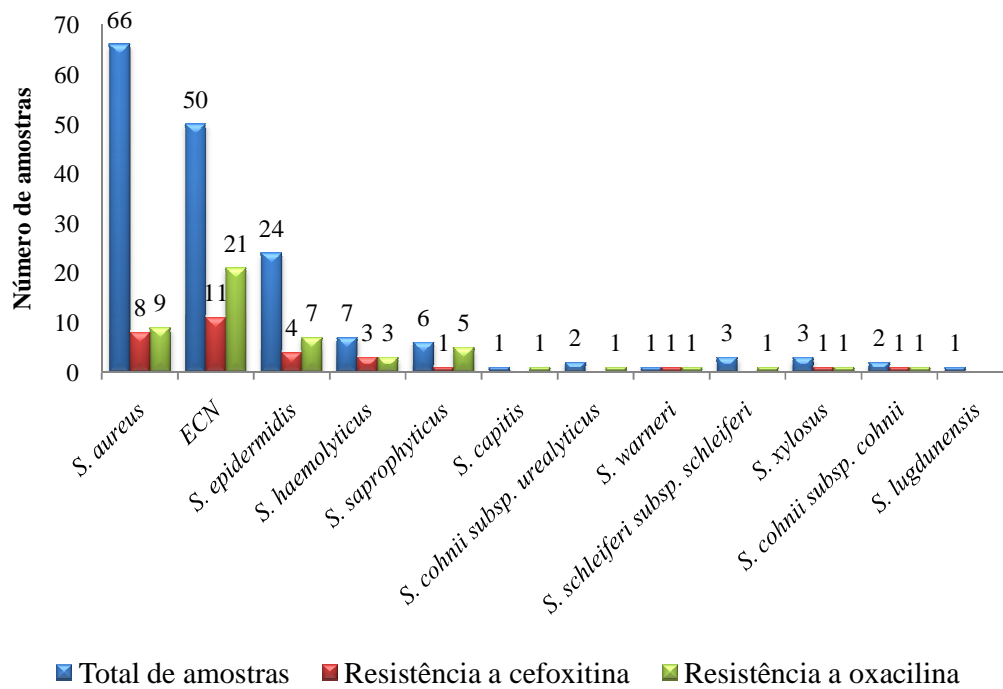


Figura 8. Total de amostras resistentes a oxacilina e cefoxitina

Com relação ao total de espécies de ECN, o teste de disco-difusão revelou que a resistência a oxacilina predominou em *S. epidermidis* (33,3%), seguido por *S. saprophyticus* (23,8%), *S. haemolyticus* (14,2%), *S. capitis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. warneri*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. xylosus* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* com 4,7% de resistência para cada uma dessas espécies. Para o disco de cefoxitina a resistência também predominou em *S. epidermidis* (36,3%), seguido de *S. haemolyticus* (27,3%) *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. cohnii* subsp. *cohnii* e *S. saprophyticus* com frequência de 9,1% para cada espécie (**Tabela 6**).

Tabela 6. Distribuição da resistência a oxacilina e cefoxitina nas amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas

Espécie	Total	Resistente a cefoxitina N(%)	Resistente a oxacilina N(%)	Gene <i>mecA</i> N(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	66	8 (12)	9 (13)	7 (11)
Estafilococos coagulase negativa	50	11 (22)	21(42)	19(38)
<i>S. epidermidis</i>	24	4 (17)	7 (29)	10(42)
<i>S. haemolyticus</i>	7	3	4	2
<i>S. saprophyticus</i>	6	1	5	2
<i>S. capitis</i>	1	0	1	1
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	2	1	1	1
<i>S. warneri</i>	1	1	1	1
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	3	0	1	1
<i>S. xylosus</i>	3	1	1	0
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	2	0	1	0
<i>S. lugdunensis</i>	1	0	0	1

4.4 Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina

Do total de 116 amostras de *Staphylococcus* spp. estudadas, o gene *mecA* foi detectado em 26 (22,4%) das amostras (**Figura 9**).

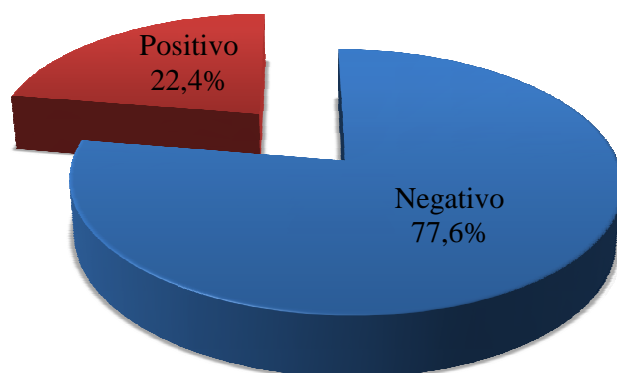


Figura 9. Presença do gene *mecA* nas amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas dos pacientes do Serviço de Dermatologia

Das 26 amostras positivas para o gene *mecA*, 19 (73%) foram espécies de ECN, sendo que 10 (53%) mostraram-se resistentes à oxacilina segundo o método de difusão de disco, enquanto para o disco de cefoxitina, somente 5 (26%) amostras mostraram-se resistentes. Os resultados revelam que 11 (22%) amostras de ECN foram resistentes a oxacilina e 4 (8%) resistentes a cefoxitina pelo método fenotípico, mas foram negativas para o gene *mecA*. (**Tabela 7**).

Tabela 7. Determinação da sensibilidade a oxacilina e cefoxitina em amostras de Estafilococos coagulase-negativa por métodos fenotípicos e genotípicos

PCR	Espécie	Disco-difusão							
		Oxacilina				Cefoxitina			
		Sensível		Resistente		Sensível		Resistente	
		N	%	N	%	N	%	N	%
<i>mecA+</i>	<i>S. epidermidis</i>	6	31,6	4	21,1	7	36,8	3	15,8
	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	1	5,3	0	0	1	5,3	0	0
	<i>S. haemolyticus</i>	0		2	10,5	0	0	2	10,5
	<i>S. lugdunensis</i>	1	5,3	0	0	1	5,3	0	0
	<i>S. saprophyticus</i>	1	5,3	1	5,3	2		0	0
	<i>S. capitis</i>	0	0	1	5,3	1	5,3	0	0
	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	0	0	1	5,3	1	5,3	0	0
	<i>S. warnerii</i>	0	0	1	5,3	0	0	1	5,3
	ECN total	9	47,4	10	52,6	13	68,4	6	31,5
<i>mecA-</i>	<i>S. epidermidis</i>	11	35,5	3	9,7	13	41,9	1	3,2
	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	0	0	1	3,2	0	0	1	3,2
	<i>S. haemolyticus</i>	3	9,7	2	6,5	4	12,9	1	3,2
	<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. saprophyticus</i>	0	0	4	12,9	3	9,7	1	3,2
	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	2	6,5	0	0	2	6,5	0	0
	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	1	3,2	1	3,2	2	6,5	0	0
	<i>S. xylosus</i>	2	6,5	1	3,2	2	6,5	1	3,2
	ECN total	19	61,3	12	38,7	26	83,9	5	16,1

ECN: Estafilococos coagulase-negativa

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

mecA+: Amostras positivas para o gene *mecA*.

mecA-: Amostras negativas para o gene *mecA*.

Das 19 amostras de ECN positivas para o gene *mecA*, 10 foram da espécie *S. epidermidis*, 2 *S. haemolyticus*, 2 *S. saprophyticus*, e um de cada uma das espécies *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. warneri*.

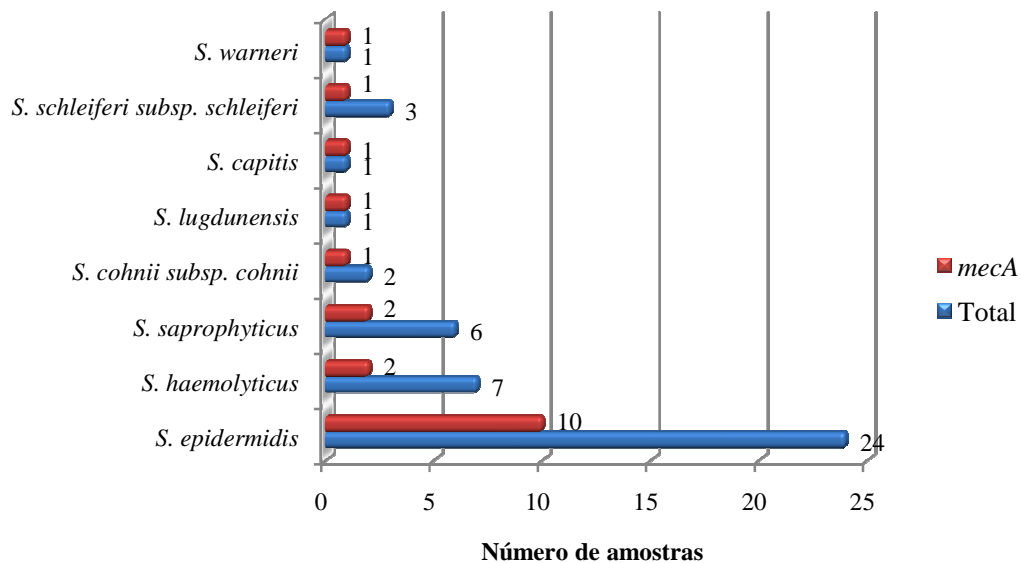


Figura 10. Distribuição do gene *mecA* nas espécies de Estafilococos coagulase-negativa isoladas.

Quanto aos *S. aureus*, o gene foi detectado em 7 (10,6%) das amostras isoladas (**Figura 11**). Dessas, 6 mostraram-se resistentes ao disco de oxacilina no teste fenotípico e 6 foram resistentes ao disco de cefoxitina. Três das amostras de *S. aureus* mostraram-se resistentes ao disco de oxacilina e 2 ao de cefoxitina, porém o gene *mecA* não foi detectado (**Tabela 8**).

Tabela 8. Determinação da sensibilidade a oxacilina e cefoxitina em amostras de *S. aureus* por métodos genotípicos e fenotípicos

PCR	Teste de disco-difusão para <i>S. aureus</i>							
	Oxacilina				Cefoxitina			
	Resistente		Sensível		Resistente		Sensível	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>mecA</i> + Nt=7	6	9,1	1	1,5	6	9,1	1	1,5
<i>mecA</i> - Nt=59	3	4,5	56	84,8	2	3,0	57	86,3
Total (N=66)	9	13,6	57	86,4	8	10,6	58	87,8

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

mecA+: Amostras positivas para o gene *mecA*.

mecA-: Amostras negativas para o gene *mecA*.

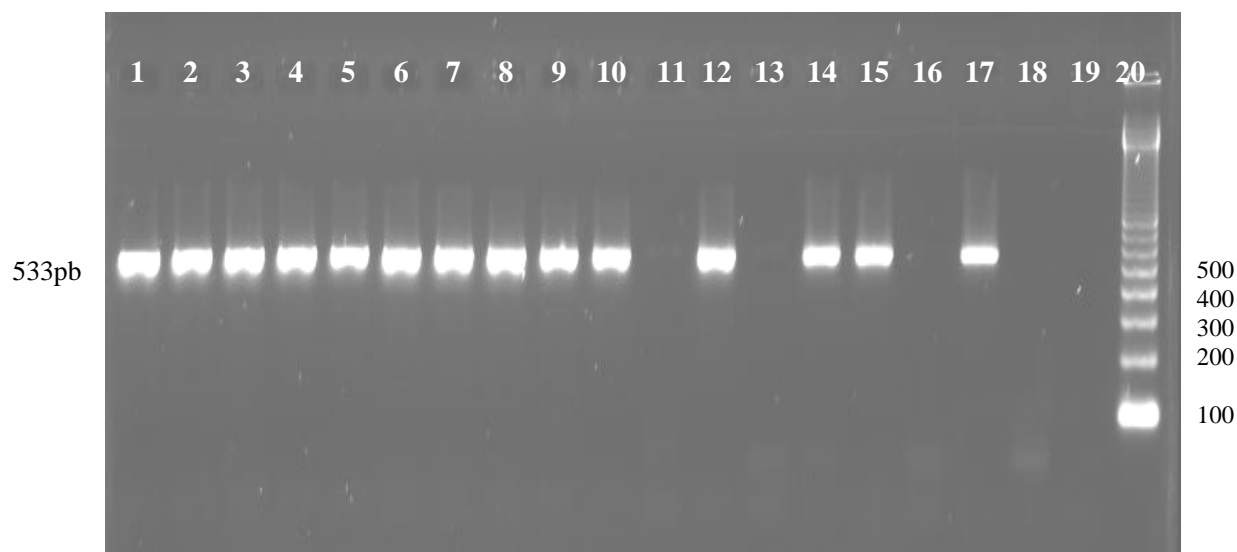


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose evidenciando amostras de *Staphylococcus* spp. *mecA* positivas poços 1 a 10, 12, 14 e 15, e negativas poços 11, 13 e 16, controle positivo 17 *S. aureus* ATCC 33591, controle negativo 18 *S. aureus* ATCC 25923, água 19.

4.5 Detecção dos genes *lukS*-PV – *lukF*-PV da leucocidina Panton-Valentine e do gene *tst* da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) em *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa

O gene que codifica a PVL foi detectado em 10 (15,1%) amostras de *S. aureus* (**Figura 13**) e não foi detectado em amostras de ECN. Das amostras de *S. aureus* que carregavam os genes da PVL, 6 foram recuperadas de furúnculo, 2 de infecções secundárias e 2 de impetigo (**Figura 12**). Não foram encontradas amostras que carregavam o gene da TSST-1 nas amostras isoladas.

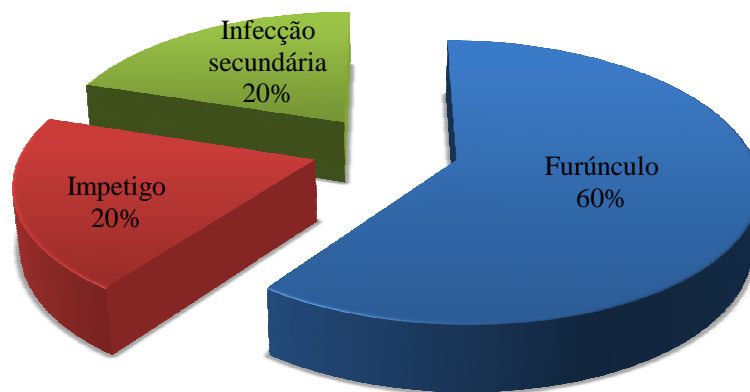


Figura 12. Distribuição do gene da toxina PVL (Leucocidina Panton-Valentine) segundo material clínico.

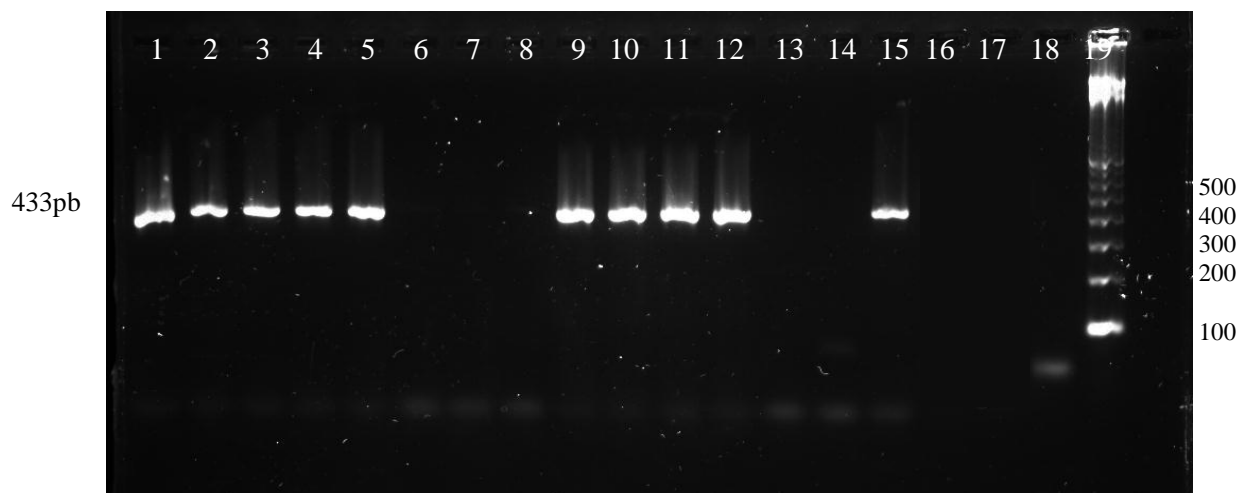


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose evidenciando a detecção dos genes *lukS*-PV e *lukF*-PV (433pb). Colunas 1-5 e 9-12 amostras de *S. aureus* positivas, 13 água, 14 controle negativo para PVL ATCC 29213, 15 controle positivo *S. aureus* ATCC 49775 e 19 ladder 100 pb.

4.6 Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão revelam maior resistência a penicilina (71,5%) seguida por eritromicina (37,8%) e clindamicina (20,7%). Os menores percentuais de resistência foram verificados para gentamicina (8,6%), trimetoprim-sulfametoxazol (4,3%), e nenhuma resistência à vancomicina ou a linezolida (**Tabela 9**).

Tabela 9. Resistência a drogas em amostras de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN)

Antimicrobiano	Resistência					
	Total		<i>S. aureus</i>		ECN	
	N= 116	%	N= 66	%	N= 50	%
Penicilina	83	71,5	53	80,3	30	60
Eritromicina	44	37,9	22	33,3	22	44
Clindamicina	24	20,7	10	15,1	14	28
Gentamicina	10	8,6	2	3,0	8	16
Teste D	7	6,0	4	6,0	3	6
Trimetoprim/Sulfametoxazol	5	4,3	0	0	5	10
Linezolida	0	0	0	0	0	0
Vancomicina	0	0	0	0	0	0

Os resultados mostraram maior percentual de resistência em amostras de ECN quando comparados com *S. aureus*, com exceção somente da penicilina com o maior percentual de resistência em *S. aureus* (80,3%) comparado com 60% em ECN. Maior percentual de resistência à penicilina, eritromicina e clindamicina foi verificado em amostras de MRSA quando comparado às amostras de MSSA, e em MRSCN comparando com os MSSCN (**Tabela 10**).

Tabela 10. Resistência a drogas em amostras de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN)

Antimicrobiano	Resistência							
	MRSA ^a		MSSA ^b		MRSCN ^c		MSSCN ^d	
	N= 7	%	N= 59	%	N= 19	%	N= 31	%
Penicilina	7	100	46	77,9	13	68,4	17	54,8
Eritromicina	3	42,8	19	32,2	12	63,1	10	32,2
Clindamicina	3	42,8	7	11,8	9	47,3	5	16,1
Gentamicina	0	0	2	3,3	4	21,1	4	12,9
Teste D	0	0	4	6,7	1	5,2	2	6,4
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0	0	0	0	3	15,8	2	6,4
Linezolida	0	0	0	0	0	0	0	0
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	0	0

MRSA^a: *S. aureus* resistente a metilina (*mecA* positivo)

MSSA^b: *S. aureus* sensível a metilina (*mecA* negativo)

MRSCN^c: Estafilococos coagulase-negativa resistente a metilina (*mecA* positivo)

MSSCN^d: Estafilococos coagulase-negativa sensível a metilina (*mecA* negativo)

4.7 Determinação do tipo de SCC_{mec}

4.7.1 Classificação do SCC_{mec} em *S. aureus*

Das 7 (10,6%) amostras de *S. aureus* que apresentaram o gene *mecA*, 1 apresentou o SCC_{mec} do tipo I, 3 do tipo II e 3 do tipo IV (Tabela 11, Figura 14).

Tabela 11. Frequência de cassetes cromossômicos encontrados em *S. aureus*

Tipos de SCC _{mec}	Nº
I	1
II	3
III	0
IV	3
Total	7

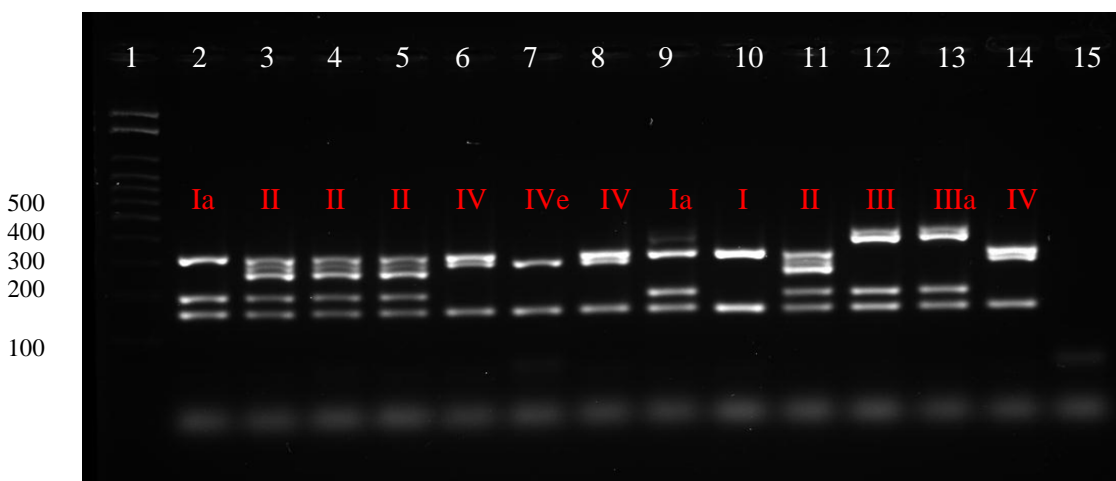


Figura 24. Gel de agarose 2% corado com Sybr ® Safe evidenciando produtos amplificados do SCCmec em *S. aureus*. 1: ladder, 2-8: amostras SCCmec positivas, cepas controle: 9: COL, 10:N315, 11: PER34, 12: AN546, 13: HU25, 14: MW2, 15: água.

A amostra de *S. aureus* que apresentou o SCCmec tipo I apresentou um perfil de resistência somente a penicilina. Quanto ao cassette do tipo II todas as 3 amostras apresentaram resistência aos seguintes antimicrobianos: cefoxitina, clindamicina, eritromicina, oxacilina e penicilina. Quanto às amostras do tipo IV, foi possível observar que todas apresentaram resistência a cefoxitina, oxacilina e penicilina e somente 1 apresentou resistência a clindamicina e 1 a eritromicina (**Figura 15**).

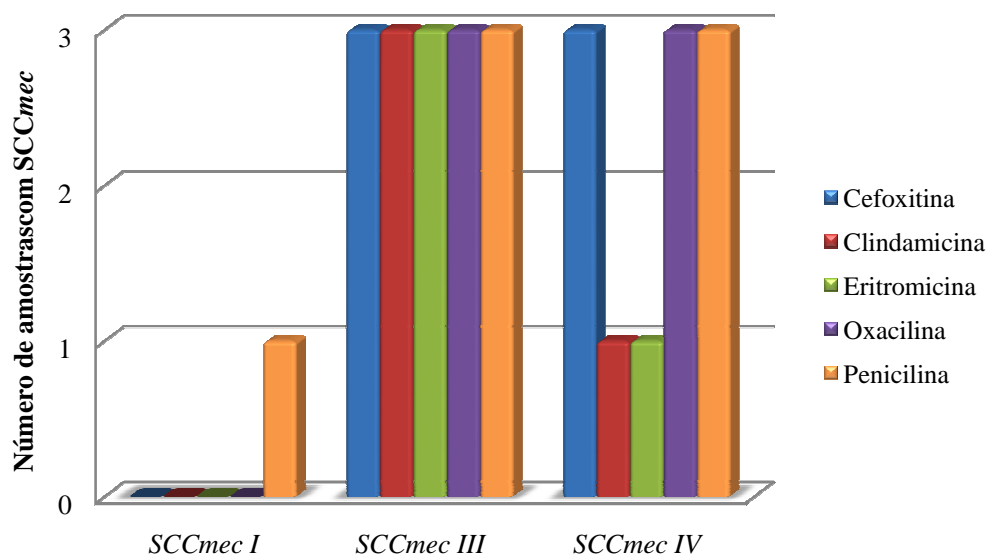


Figura 15. Distribuição das resistências fenotípicas encontradas nas amostras de *S. aureus* de acordo com o tipo de cassette.

4.7.2 Classificação de SCCmec em ECN

Das 19 amostras de ECN *mecA* positivas encontradas, foi possível tipar 12 amostras sendo o tipo IV o mais encontrado (26%). (**Tabela 12**).

Tabela 12. Tipos de SCCmec encontrados em ECN

Tipos de SCCmec	ECN	
	N ^o	%
I	2	10
II	2	10
III	3	16
IV	5	26
Não tipável*	7	37
Total	19	100%

Não Tipável*: Amostras *mecA* positivas que não tiveram o SCCmec tipados pela técnica utilizada

A **Tabela 13** e a **Figura 16** apresentam o perfil de resistência dos tipos de SCCmec encontrados. Foi verificado um perfil de multirresistência em praticamente

todos os tipos de cassetes onde, somente uma amostra do tipo II foi sensível a todas as drogas testadas.

Tabela 13. Relação das espécies de Estafilococos coagulase-negativa, os tipos de cassette encontrados e os respectivos perfis de susceptibilidade encontrados

Espécie	SCCmec*	Resistências
<i>S. haemolyticus</i>	I	Cefo, Oxa, Pen, Clin, Gen(I)*
<i>S. haemolyticus</i>	III	Cefo, Oxa, Pen, Clin, Eri, Genta
<i>S. saprophyticus</i>	I	Eri
<i>S. saprophyticus</i>	Não tipado**	Oxa, Clin, Eri
<i>S. lugdunensis</i>	II	Nenhuma
<i>S. epidermidis</i>	II	Oxa, Pen, Clin, Eri, Gen (I)*
<i>S. epidermidis</i>	III	trm/stx, Pen, Clin, Eri, Genta
<i>S. epidermidis</i>	III	Pen
<i>S. epidermidis</i>	IV	Pen, Clin, Eri, trm/stx
<i>S. epidermidis</i>	IV	Cefo, Oxa, Pen, Eri, trm/stx
<i>S. epidermidis</i>	IV	Oxa, Pen, Eri
<i>S. epidermidis</i>	IV	Oxa, Eri, trm/stx
<i>S. epidermidis</i>	IV	Pen, Clin
<i>S. epidermidis</i>	Não tipado**	Eri, Teste D
<i>S. epidermidis</i>	Não tipado**	Cefo, Pen, Clin, Eri
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Não tipado**	Oxa, Pen
<i>S. warneri</i>	Não tipado**	Cefo, Oxa, Pen
<i>S. capitis</i>	Não tipado**	Oxa, Pen, Clin
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Não tipado**	Eri

Cefo: cefoxitina 30µg, Clinda: clindamicina 2µg, Oxa: oxacilina 1µg, Pen: Penicilina G 10U, Eri: eritromicina 15µg, trm/stx: trimetoprim/sulfametoxazol 25µg, linez: linezolida 30µg, Teste D: Teste de resistência induzida a clindamicina, Gen(I)*: Resistência intermediária a gentamicina. **SCCmec***: Cassete cromossômico Estafilocócico *mec*.

Não tipado**: amostras *mecA* positivas cujo cassetes não foram tipados pelo protocolo utilizado.

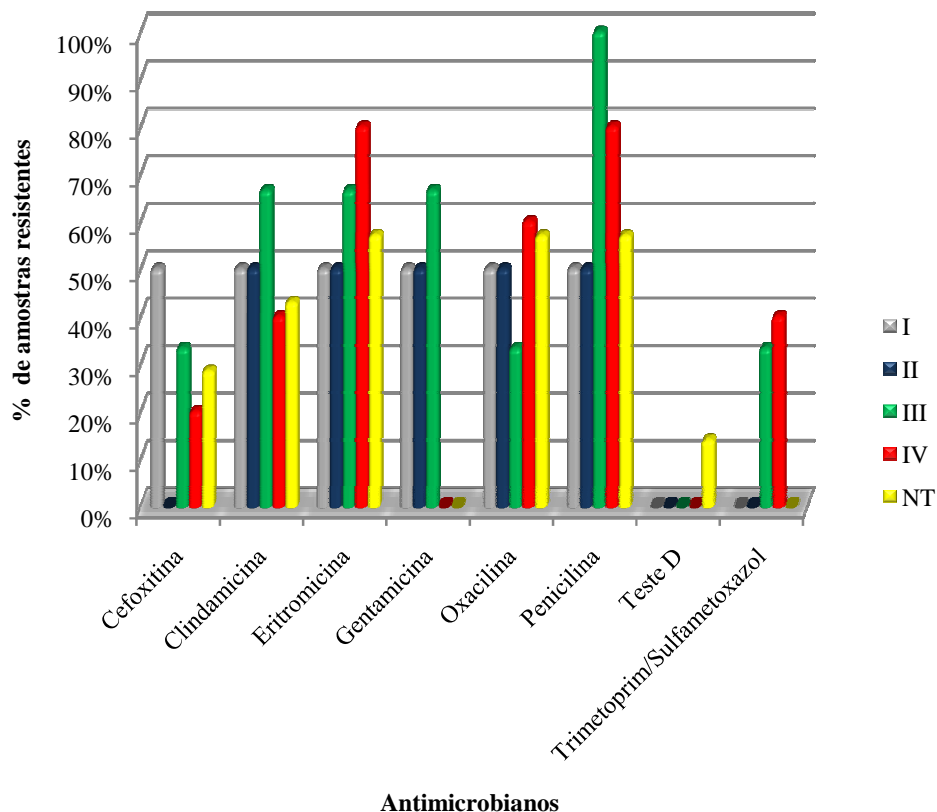


Figura 16. Resistência a antimicrobianos de acordo com os tipos de SCCmec em ECN

4.8 Análise Estatística

A avaliação da sensibilidade e da especificidade dos métodos fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina comparando com a detecção do gene *mecA* (padrão ouro) mostrou para o disco de cefoxitina uma sensibilidade de 26,3% e especificidade de 87,1% e, para o disco de oxacilina, a sensibilidade foi de 52,6% e especificidade de 64,5% para as espécies de ECN. Para as amostras de *S. aureus*, a sensibilidade para o disco de cefoxitina foi maior, 85,7%, e a especificidade de 96,6%, enquanto que para o disco de oxacilina, a sensibilidade foi a mesma, e a especificidade foi ligeiramente menor, 94,9% (**Tabela 14**).

Tabela 14. Comparação da presença do gene *mecA* com métodos fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina e cefoxitina por difusão de disco.

Métodos Fenotípicos	ECN		<i>S. aureus</i>	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
	%	%	%	%
Cefoxitina	26,3	87,1	85,7	96,6
Oxacilina	52,6	64,5	85,7	94,9

Com relação a faixa etária estudada e o tipo de SCC*mec* encontrado nas amostras nas amostras de *Staphylococcus aureus* estudadas, os tipos II e III estiveram mais presentes em pacientes entre 41 a 80 anos de idade, enquanto que o SCC*mec* do tipo IV apresentou distribuição predominante na faixa etária de 11 a 50 anos. Amostras de MSSA positivas para o gene da PVL apresentaram distribuição variada entre as faixas etárias tendo maior frequência em indivíduos jovens (**Tabela 15**).

Tabela 15. Relação do tipo de SCC*mec*, amostras PVL positiva e a Faixa Etária da população estudada em *S. aureus*

Faixa etária	SCC <i>mec</i> ¹				N/T ³	PVL ²
	I	II	III	IV		Positivo
0 – 10	0	0	0	0	2	1
11 – 20	0	0	0	3	2	1
21 – 30	1	0	0	1	1	1
31 – 40	0	0	0	0	0	3
41 – 50	0	2	0	2	0	2
51 – 60	0	1	1	2	1	1
61 – 70	0	2	0	1	0	0
71 – 80	2	0	2	0	0	1
81 – 90	0	0	0	0	0	0
Total	3	5	3	9	6	10

SCC*mec*¹: Staphylococcal cassette chromosome *mec*

PVL²: Leucocidina Pantón-Valentine

N/T³: Não tipáveis pela técnica utilizada

4.8.1 Fatores de risco do hospedeiro para aquisição de MRSA

A análise univariada dos fatores de risco do hospedeiro revelou, que o fator de risco para aquisição de MRSA foi a utilização prévia do antimicrobiano ciprofloxacina [OR: 8,75 (1,59-48,29). $p= 0,04$]. No entanto, pela análise multivariada, além da ciprofloxacina [OR: 8,75 (1,59-48,29) $p=0,01$], trabalhar na área da saúde também representou um fator de risco para aquisição de MRSA [OR: 17,5 (1,22-250,36) $p= 0,04$] (**Tabela 16**).

Tabela 16. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco para aquisição de MRSA.

Fator de Risco	Análise Univariada				Análise Multivariada	
	Casos (7)	Não casos(119)	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
<i>Dados demográficos</i>						
Gênero Feminino	6 (89,7)	57 (47,9)	6,53 (0,76-55,88)	0,052		
Idade em anos (média)	48 (13-72)	46 (0-82)	...	0,64		
Residência em área urbana	7 (100,0)	107 (89,9)	...	1,00		
Trabalhar na área rural	1 (14,3)	16 (13,4)	1,07 (0,12-9,51)	1,00		
Trabalhador da área da saúde	1 (14,3)	2 (1,7)	9,75 (0,77-123,23)	0,16	17,5 (1,22-250,36)	0,04
Paciente aposentado	2 (28,6)	18 (15,1)	2,24 (0,40-12,57)	0,31		
Salário >R\$1.000,00*	2 (28,6)	35 (29,4)	0,96 (0,18-5,19)	1,00		
<i>Admissão previa em hospital e procedimentos</i>						
Admissão prévia em hospital	2 (28,6)	20 (16,8)	1,98 (0,36-10,93)	0,61		
Cirurgia anterior	1 (14,3)	10 (8,4)	1,82 (0,20-16,62)	0,48		
Drenagem de abscesso	0 (0,0)	6 (5,0)	0,0 (...)	1,00		
<i>Comorbidade de base</i>						
Diabetes mellitus	2 (28,6)	21 (17,6)	1,87 (0,34-10,28)	0,61		
Uso de insulina	1 (14,3)	6 (5,0)	3,14 (0,32-30,40)	0,34		
Doenças dermatológicas de base	0 (0,0)	4 (3,4)	0,0 (...)	1,00		
<i>Características da infecção presente</i>						
Secundária ao trauma local	3 (42,9)	49 (41,2)	1,07 (0,23-5,00)	1,00		
Duração > 30 dias	4 (57,1)	56 (47,1)	1,50 (0,32-6,99)	0,78		
<i>Uso prévio de antimicrobianos</i>						
Qualquer antimicrobiano	4 (57,1)	40 (33,6)	2,63 (0,56-12,34)	0,24		
Penicilina benzatina	0	2 (1,7)	0,0 (...)	1,00		
Amoxicilina	2 (18,6)	16 (13,4)	2,58 (0,46-14,14)	0,26		
Cefalexina	0 (0,0)	26 (21,4)	0,0 (...)	0,34		
Clindamicina	2 (28,6)	11 (9,2)	3,93 (0,68-22,67)	0,15		
Ciprofloxacina	3 (42,9)	12 (10,1)	6,69 (1,34-33,41)	0,04	8,75 (1,59-48,29)	0,01
Macrolídeos	0 (0,0)	3 (2,5)	0,0 (...)	1,00		
<i>Outros dados relevantes</i>						
Prática de esportes	0 (0,0)	17 (14,3)	0,0 (...)	0,59		
Uso de drogas ilícitas	0 (0,0)	12 (10,1)	0,0 (...)	1,00		

Nota: Dados estão em número (%), ou estão especificados

*Aproximadamente US\$ 500,00

OR, Odds Ratio. CI, Intervalo de Confiança.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foram analisadas culturas de infecções de pele obtidas de pacientes atendidos na triagem da dermatologia do HC da FMB. As culturas recuperaram em maior frequência *S. aureus* em 56,9% das amostras coletadas e 43,1% de ECN. *S. aureus* foi considerado o principal agente de infecções de pele como impetigo, celulite, furúnculo, carbúnculo e foliculites, onde outras espécies do gênero *Staphylococcus* raramente são citadas ou caracterizadas como agentes principais dessas infecções.⁷² Estudos realizados no âmbito da colonização em indivíduos com infecções de pele relatam que a colonização por *S. aureus* predispõe o hospedeiro a infecções.³⁵ Altas frequências de isolamento de *S. aureus* em infecções primárias e secundárias são comuns podendo chegar até 72%.²⁴

Estafilococos coagulase-negativa (ECN) isolados das infecções de pele como impetigo, infecção secundária, onicocriptose, furunculose, osteomielite, hidradenite e celulite, foram identificados em nível de espécie. As espécies de ECN são agentes de infecções hospitalares como bacteremia, infecções relacionadas a cateter, infecções do sistema nervoso, endocardites, infecção do trato urinário, de sítio cirúrgico e endoftalmites.²³ Estão frequentemente relacionados a infecções em indivíduos imunocomprometidos¹⁷ ou com o sistema imunológico em formação, como é o caso de recém nascidos principalmente submetidos a procedimentos invasivos, muito frequente em UTI Neonatal.¹⁴ A presença de espécies de ECN compoendo a microbiota da pele predispõe o hospedeiro a infecções oportunistas através do rompimento de barreiras naturais por meio de lesões cutâneas, cateteres e agulhas em conjunto com os fatores bacterianos de adesão que contribuirão para o sucesso da invasão no hospedeiro.³⁴ Nos casos onde isolaram-se espécies de ECN nesse estudo, os pacientes apresentaram rompimento das barreiras naturais, o que explica seu isolamento.

Pôde-se isolar 8 espécies diferentes de *Staphylococcus* spp. dos 23 pacientes portadores de Diabetes Mellitus: 14 (61%) *S. aureus*, 2 (9%) *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, 1 (4%) de cada uma das seguintes espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. xylosus*. O sistema imunológico de pacientes diabéticos apresenta-se mais susceptível a infecções devido à menor capacidade de fagocitose pelos polimorfonucleares, atividade diretamente influenciada pela hiperglicemia e acidose, às alterações das atividades de opsonização, aderência e quimiotaxia dos leucócitos, alteração do sistema antioxidante e menor produção de interleucinas (IL2).⁶⁴

Foram realizados teste de disco-difusão para investigar as características da resistência fenotípica a meticilina e detecção genotípica do gene *mecA* que confere essa resistência nos microrganismos isolados. Das 7 amostras de *S. aureus mecA* positivas, 6 demonstraram resistência a oxacilina e a cefoxitina no teste de disco-difusão. Para as amostras de ECN, pode-se observar que das 19 amostras que carregaram o gene *mecA*, somente 10 foram resistentes a oxacilina e 5 a cefoxitina. Dificuldades na detecção da resistência fenotípica a oxacilina são um desafio para o microbiologista clínico, visto que a expressão do gene *mecA* difere entre populações de uma mesma linhagem.⁷⁰ A PCR é a técnica padrão ouro para detecção do gene *mecA*, porém ela detecta qualitativamente não sendo possível quantificar a expressão nas subpopulações bacterianas.

Das 90 amostras negativas para o gene *mecA*, 7 (7%) apresentaram resistência ao disco de cefoxitina e 14 (15%) ao disco de oxacilina. Tal fato pode ser devido à hiperprodução de beta-lactamase, na qual cepas negativas para o gene *mecA* são capazes de inativar antimicrobianos estáveis a ação das penicilinas, caracterizando a resistência ou sensibilidade *borderline* a oxacilina.⁴² Cepas com esse tipo de resistência

são denominadas BORSA (*S. aureus* com resistência *borderline* a oxacilina) e, em relatos anteriores, estavam associadas a casos de infecções de sítio cirúrgico em pacientes profilaticamente tratados com cefazolina.³¹ A detecção da hiperprodução da enzima pode contribuir para a escolha correta do tratamento, uma vez que a ação da beta-lactamase pode ser inibida eficientemente pelo ácido clavulânico e pelo sulbactam adicionado ao tratamento com beta-lactâmicos.⁴²

Além da detecção do gene de resistência, foram traçados os perfis toxigênicos das amostras para os genes da PVL e da TSST-1 em todas as amostras recuperadas. Nenhuma amostra apresentou o gene da TSST-1. Relatos anteriores mostram que as cepas oriundas de infecções de pele, que não possuam evidências de esfoliação, dificilmente carreavam o gene da TSST-1.⁵³

Das dez amostras de *S. aureus* que apresentaram o gene da PVL (Leucocidina Panton-Valentine) todas foram sensíveis à oxacilina e resistentes a penicilina, e sete amostras foram resistentes somente a penicilina. Nenhuma das amostras de CA-MRSA (SCC*mec* IV) carregou o gene da PVL. Estudo realizado com amostras de CA-MRSA revelam a presença da PVL em todas as cepas analisadas.⁵³ Em contraste, algumas cepas isoladas anteriormente não carregaram os genes *lukS*-PV e *lukF*-PV mesmo possuindo propriedades genotípicas e fenotípicas idênticas e características clínicas similares às PVL positivas.⁸³ Têm-se observado em modelos animais que cepas USA300 e USA400 Knockout para a PVL podem apresentar características tão letais e virulentas quanto o tipo selvagem causando doenças de pele similares e com a mesma capacidade de lisar neutrófilos humanos sobrevivendo após a fagocitose.⁷⁸

As amostras que carregaram os genes *lukS*-PV e *lukF*-PV, no presente estudo, foram responsáveis por ambas infecções primárias (furúnculo e impetigo) e secundárias. Apesar de carregarem os genes da toxina, não foram resistentes a oxacilina nem positivas

para o gene de resistência *mecA*. Esses achados concordam com estudos anteriores, onde amostras de *S. aureus* isoladas de ambos os tipos de infecções carregaram os genes PVL, mas não carregaram o gene *mecA*.²⁴

Com relação à sensibilidade antimicrobiana do total das amostras do gênero *Staphylococcus* estudadas, notou-se que 83 (71,5%) amostras apresentaram resistência a penicilina, 44 (37,9%) a eritromicina, 30 (25,8%) a oxacilina, 24 (20,7%) a clindamicina sendo 7 (6,0%) com resistência induzida a clindamicina, 19 (16,4) a cefoxitina, 8 (6,9%) a gentamicina, 5 (4,3%) foram resistente a trimetoprim/sulfametoxazol, nenhuma a vancomicina e a linezolida. Em estudo realizado com pacientes sem fatores de risco, as amostras de *S. aureus* isoladas apresentaram valores de resistências para penicilina de 100%, 15,7% para eritromicina, 2,4% para clindamicina, 6,0% para gentamicina e 24,1% para trimetoprim/sulfametoxazol.⁷⁴ As amostras do presente trabalho apresentaram valores de resistência similares somente à gentamicina, e quanto às outras drogas as diferenças foram significativas. Diferenças na sensibilidade de *S. aureus* isolados de amostras da comunidade podem ser atribuídas às diferenças regionais de tratamento antimicrobiano.

A classificação do cassete cromossômico revelou que os cassetes mais comuns foram do tipo Ia, II e IV em pacientes com infecções por MRSA. Evidências anteriores apontam esses três tipos de SCC*mec* como os mais encontrados colonizando indivíduos na comunidade, prevalecendo o tipo IV.³⁸

Nas amostras com SCC*mec* IV houve variação no perfil de resistência, as três amostras foram resistentes a penicilina, oxacilina e cefoxitina, e uma foi adicionalmente resistente a clindamicina e a eritromicina. Esse perfil de resistência entre amostras de CA-MRSA foi encontrado anteriormente em estudo realizado no Brasil, onde amostras de *S. aureus* resistentes a metilina foram analisadas quanto ao perfil de sensibilidade

entre pacientes sem fatores de risco. Observou-se que 100% das amostras foram resistentes a penicilina e a oxacilina, 25,5% a clindamicina e 33,3% a eritromicina.⁵² No presente estudo foi possível observar índices de resistência nas amostras de CA-MRSA similares aos encontrados por Nascimento-Carvalho et al⁵² para os antimicrobianos citados. Em contrapartida, outros estudos brasileiros relatam que as cepas isoladas apresentaram resistência somente a beta-lactâmicos.^{20, 59, 69}

A amostra de *S. aureus* que apresentou o SCCmec do tipo Ia foi resistente fenotipicamente somente a penicilina, isso pode estar relacionado ao fato de que esse cassete é pequeno e carrega somente o gene *mecA*.⁴⁰ Das amostras de *S. aureus* com o SCCmec do tipo II, todas as três apresentaram resistência a cefoxitina, oxacilina, penicilina, clindamicina e eritromicina. Outros estudos relatam a ocorrência de cepas hospitalares recuperadas de infecções de pele o que reforça a importância de identificar molecularmente o tipo de cassete cromossômico para confirmar a origem do isolado.⁵⁵ Essas altas taxas de resistência em amostras que carregam o cassete do tipo II já foram relatadas anteriormente⁴⁹ onde foi observado que 100% das amostras apresentaram resistência a penicilina, oxacilina e eritromicina e 42% resistente a clindamicina. O cassete do tipo II carrega genes de resistência a várias classes de antimicrobianos e, por essa razão, é um dos cassetes cromossômicos maiores e mais pesados, caracterizando cepas multirresistentes.⁴⁰

A taxa de isolamento de MRSA na comunidade obtida por esse estudo, dentre os *S. aureus* isolados, foi de 10,6%. Estudos similares evidenciaram valores próximos aos encontrados por esse estudo, compreendendo valores entre 9,6%⁷⁴ a 10,9%.⁵¹

Dentre as amostras de MSSA, foi possível observar que 45 (76,2%) apresentaram resistência a penicilina, 17 (28,8%) a eritromicina, 6 (10,2%) a clindamicina, 3 (5,1%) a gentamicina e 4 (8%) resistência induzida MLSBi. Com

exceção da gentamicina, Saikia et al (2009)⁶⁷ observaram em MSSA de origem hospitalar, um padrão de resistência similar ao encontrado no presente estudo com valores de 72,8% para gentamicina, 25% para eritromicina, 9,4% para clindamicina, e 3,3% das amostras mostraram resistência induzida MLSBi. O perfil de resistência dos MSSA obtidos nesse estudo se assemelharam ao perfil apresentado pelos MSSA isolados em ambientes hospitalares.⁶⁷ Estudo realizado com MSSA de origem comunitária revelou alto nível de resistência a penicilina (100%), enquanto que para outras drogas como gentamicina (6,7%), clindamicina (1,3%) e eritromicina (8,0%) os níveis foram menores.⁷⁴ Com relação a taxa de resistência a gentamicina (6,7%), o dado foi similar ao encontrado no presente estudo (5,1%). No entanto, para a penicilina a taxa de resistência detectada nesse estudo foi menor (76,2%), enquanto que para clindamicina e eritromicina os percentuais de resistência apresentaram-se mais elevados.⁷⁴

A técnica utilizada para classificar os cassetes foi eficiente para 75% das amostras de ECN positivas para o gene *mecA*. Essa dificuldade em tipar certos cassetes cromossômicos de *Staphylococcus* spp. foi relatada por outros autores^{40,75} e pode ser atribuída às novas estruturas no cassete decorrentes de rearranjos em regiões específicas.⁴⁰ Outros estudos tentaram tipar os SCC*mec* em MRSA pela técnica de Oliveira e Lencastre⁵⁶ não sendo possível tipar 2,93% das cepas na Espanha e 3,54% das cepas isoladas na Flórida. Outro método desenvolvido por Zhang et al⁸⁰ também não conseguiu tipar 100% dos SCC*mec*, provavelmente em decorrência da presença de novos tipos e subtipos estruturais ou rearranjos e recombinação do elemento *mec*.⁸⁰

Com relação às resistências fenotípicas apresentadas pelos tipos de SCC*mec* das amostras de ECN, pode-se observar que mesmo apresentando o gene *mecA* não foi possível detectar a resistência a oxacilina fenotipicamente em todas as amostras. Mesmo

com a presença do gene, houve 9 (47,4%) amostras sensíveis a oxacilina resultando uma sensibilidade de 52,6% e especificidade de 64,5% com relação ao teste de difusão com disco de oxacilina. Com relação ao disco de cefoxitina, a sensibilidade foi de 26,3% e a especificidade foi de 87,1%. Tais resultados contradizem com estudos anteriores de Pereira et al⁵⁸ onde foram observados valores de especificidade de 98,8% para os discos de oxacilina e de cefoxitina, e sensibilidade de 100% para cefoxitina e 94,4% para oxacilina em amostras isoladas da Unidade Neonatal de Terapia Intensiva (UTI-NEO). A origem das amostras pode explicar tal discrepância, uma vez que dentro do ambiente hospitalar o contato com antimicrobianos é frequente e o patógeno está mais adaptado a essa pressão seletiva expressando prontamente genes de resistência, facilitando a detecção no teste *in vitro*. Já patógenos comunitários, não enfrentam tal pressão seletiva com a mesma frequência não necessitando da expressão frequente dos genes de resistência.

Resistência a antimicrobianos não beta-lactâmicos foram observadas em todos os tipos de SCC*mec*, inclusive naqueles não caracterizados. Foi possível observar que o SCC*mec* III em ECN apresentaram resistências fenotípicas a ampla gama de antimicrobianos devido aos vários genes de resistência presentes no cassete, concordando com dados encontrados anteriormente.^{25, 26} Vale ressaltar que apesar de considerados como agentes colonizadores e contaminantes de culturas, é comprovado que os ECN podem servir como fontes de genes de resistência e virulência para o *S. aureus*.

A avaliação dos dados coletados da população estudada revelou como fatores de risco para aquisição de MRSA, a utilização prévia de ciprofloxacina e trabalhar na área da saúde. Estudos^{45,73} verificaram que a utilização de fluorquinolonas, com destaque para a ciprofloxacina, favoreceu significativamente a colonização de pacientes

hospitalizados por MRSA. Antimicrobianos atingem níveis de concentração diferentes em determinados sítios de infecção e, com isso, podem atingir níveis subinibitórios para o tratamento. Estudo indica que esses níveis podem contribuir para um aumento na expressão de proteínas ligadoras de fibronectina em amostras que possuem genes mutantes para os genes da topoisomerase IV e DNA girase (*grlA* e *gyrA* respectivamente) das cepas de MRSA.⁴ Bisognano et al⁴ notaram que a mutação nos sítios que conferem a resistência a fluorquinolonas sob concentrações subinibitórias de ciprofloxacina aumenta, de alguma forma, a expressão dos genes *fnb* que codificam a proteína ligadora de fibronectina, mas os mecanismos ainda não foram definidos. No presente estudo pacientes que fizeram uso prévio de ciprofloxacina apresentaram chance de 8,75 (p= 0,01) maior de serem colonizados por MRSA.

Outro fator de risco encontrado para aquisição de MRSA foi trabalhar na área da saúde onde o contato e a exposição aos pacientes e fômites colonizados dentro do ambiente hospitalar proporciona a colonização da equipe. Alguns estudos mostram que enfermeiros podem carrear mais do que os próprios pacientes.⁷⁹ Em um surto ocorrido na Califórnia em uma base de treinamento militar, foram apontados como principais fatores de risco para a aquisição de CA-MRSA, a presença de algum colega de quarto com infecções primárias de pele e o contato com pessoas que trabalham em setores de saúde⁷ demonstrando assim a importância da influência desse ambiente na colonização dos indivíduos e da transmissão às pessoas de contato próximo.

Lu et al³⁸ verificaram que a colonização por *S. aureus* em voluntários da comunidade era maior do que a de indivíduos em ambientes de sistemas de saúde. No entanto, a colonização por MRSA foi significativamente maior em indivíduos de ambientes hospitalares. Como fatores de risco de aquisição de cepas resistentes

apontaram que o contato com sistema de saúde favorece colonização por MRSA concordando com dados obtidos no presente trabalho.

Com relação à faixa etária e o tipo de *SCCmec* encontrado, observou-se que o tipo IV e os não tipáveis estavam predominando nos pacientes mais jovens comparado à faixa etária predominante dos tipos I, II e III. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que defendem a relação entre a faixa etária e a distribuição dos tipos de *SCCmec* encontrados, onde o tipo IV estava mais relacionado a pacientes jovens e o tipo II, a pacientes idosos.¹¹ A predominância das cepas positivas para o gene da PVL foi diferente com relação à predominância do cassete do tipo IV, tendo uma distribuição homogênea nas faixas etárias estudadas o que discorda de estudos que defendem que a distribuição da PVL é igual ao do cassete do tipo IV.¹¹

Conclusões

6. Conclusões

- *S. aureus* foram os principais agentes causadores de infecções de pele nos pacientes estudados da comunidade, sendo 10,6% MRSA, com a maioria apresentando SCCmec tipo IV e II.
- Apesar da menor frequência com que foram isolados das infecções de pele, os ECN apresentaram maior número de amostras resistentes e com o gene *mecA* (38%), com maior frequência do SCCmec tipo IV.
- A resistência a outras classes de antimicrobianos foi encontrada tanto em cepas que carregaram o gene *mecA* quanto em amostras negativas para este. Amostras de ambas as espécies carregaram cassetes característicos de ambientes hospitalares, porém não houve diferença em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos entre o SCCmec do tipo IV e os outros tipos de SCCmec.
- Os métodos fenotípicos de detecção da resistência a meticilina foram mais sensíveis e específicos para amostras de *S. aureus* do que para ECN.
- No presente estudo não foi encontrado MRSA carregando o gene da toxina PVL e nem da TSST-1 em amostras de *S. aureus* e ECN. Porém, outras investigações deverão ser realizadas para a pesquisa de outros genes de virulência nessas amostras.
- Os fatores de risco encontrados para o carregamento de MRSA foram o uso prévio da ciprofloxacina e o contato com serviços de saúde concordando com outros estudos anteriores.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Alvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincón S, Diaz L, Vanegas N, Arias CA. Community associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 2000-2001.
2. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 2002; 359: 1819-1827.
3. Bisno AL, Stevens DL. Streptococcal Infections of Skin And Soft Tissues. *Eng J Med.* 1996; 334: 240-245.
4. Bisognano C, Vaudaux PE, Lew DP, NG EYW, Hooper DC. Increased Expression of Fibronectin-Binding Proteins by Fluoroquinolone-Resistant *Staphylococcus aureus* Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. *Antim Ag Chem.* 1997; 41(5): 906–913.
5. Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful Multiresistant Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage from Taipei, Taiwan, That Carries Either the Novel Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (*SCCmec*) Type VT or *SCCmec* Type IV. *J Clin Micr.* 2005; 43: 4719–4730.
6. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. *Lab Invest.* 2007; 87; 3–9.
7. Campbell KM, Vaughn AF, Russell KL, Smith B, Jimenez DL, Barrozo CP, Minarcik JR, Crum NF, Ryan MAK. Risk Factors for Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in an Outbreak of Disease among Military Trainees in San Diego, California, in 2002. *J Clin Microb.* 2004 42: 9; 4050–4053.
8. Cavalcanti SMM, De França ER, Vilela MA, Montenegro F, Cabral C, Medeiros ÂCR. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. *Bras Epidem.* 2006; 9: 436-446.
9. Chambers HF. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Micr Rev.* 1997; 10: 781–791.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Tenth Edition (M02-A10). CLSI, 2009

11. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Brit Med Bull.* 2010; 94: 215–227
12. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 855-860.
13. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Jr JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Braz J Micr.* 2006; 37: 64-69.
14. Cunha MLRS, Rugolo LMSS, Lopes CAM. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(6): 661-668.
15. David MZ, Crawford SE, Boyle-Vavra S, Hostetler MA, Kim DC, Daum RS. Contrasting Pediatric and Adult Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 631-637.
16. d’Azevedo PA, Inoue FM, Andrade SS, Tranchesi R, Pignatari ACC. Pneumonia necrotizante por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. *Soc Bras Med Trop.* 2009; 42: 461-462.
17. d’ Azevedo PA, Antunes ALS, Martino MDV, Pignatari ACC. *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus*: relato de caso de um patógeno incomum. *Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(2): 197-199.
18. Euzéby, JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus* [Internet]. [place unknown: publisher unknown]; [up dated 2010 june 4; cited 2010 june 15]. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>
19. Fortes CQ, Espanha CA, Bustorff FP, Zappa BC, Ferreira ALP, Moreira RB, et al. First Reported Case of Infective Endocarditis Caused by Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Not Associated With Healthcare Contact in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 541-543.
20. Gelatti LC, Sukiennik T, Becker AP, Inoue FM, Carmo MS, Castrucci FMS, et al. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. *Soc Bras Med Trop.* 2009; 42: 458-460.
21. Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JUE. Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob Chemother.* 2004; 48: 285–296.
22. Hanssen AM, Sollid JUE. Multiple Staphylococcal Cassette Chromosomes and Allelic Variants of Cassette Chromosome Recombinases in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci from Norway. *Antimicrob Chemother.* 2007; 51: 1671–1677.

23. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-Negative Staphylococci: Role as Pathogens. *Ann Rev Med*. 1999; 50: 223-236.
24. Issartel B, Tristan A, Lechevallier S, Bruye`re F, Lina G, Garin B, Lacassin F, Bes M, Vandenesch F, Etienne J. Frequent Carriage of Panton-Valentine Leucocidin Genes by *Staphylococcus aureus* Isolates from Surgically Drained Abscesses. *J Clin Microb*. 2005; 43(7): 3203–3207.
25. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto, K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Chemother*. 2001; 45: 1323–1336.
26. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire *mec* DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Chemother*. 1999; 43: 1449–1458.
27. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Chemother*. 2004; 48: 2637–2651.
28. IWG-SCCmec. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements. [home page on the Internet]. [place unknown: publisher unknown]; [updated unknown; cited 2011 june 07]. Available from: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html
29. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun*. 2002; 70: 631–641.
30. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Micr*. 1991; 29: 426-430.
- 31.. Kernodle DS, Classen DC, Stratton CW, Kaiser AB. Association of Borderline Oxacillin-Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* with Surgical Wound Infections. *J Clin Micr*. 1998; 36(1): 219–222.
- 32.. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA*. 2007; 298: 1763-1771.
- 33.. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrob Chemother*. 2007; 51: 264–274.

34. Kloos WE, Bannerman TL. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Micro Rev.* 1994; 7(1): 117-140.
35. Kluytmans J, Belkum AV, Verbrugh H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Clin Micro Rev.* 1997; 10(3): 505–520.
36. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 1128–1132.
37. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Rev Panam Infectol.* 2005; 7: 34-36.
38. Lu PL, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L, Siu LK. Risk Factors and Molecular Analysis of Community Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage. *J Clin Microb.* 2005; 43(1): 132–139.
39. Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 1328–1333.
40. Martins A, Cunha MLRS. Methicilin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 787-795.
41. Martins A, Pereira VC, Cunha MLRS. Staphylococcus aureus resistance to oxacillin in isolates from the Clinical Hospital of Botucatu Medical School, Brazil. *Chemother.* 2010; 56: 112-119.
42. McDougal LK, Thornsberry C. The Role of 13-Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. *J Clin Microb.* 1986; 23(5): 832-839.
43. McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JES, Summers AO, Patel JB. Emergence of Resistance among USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Invasive Disease in the United States. *Antimicrob Ag Chemother.* 2010; 54(9):3804–3811.
44. Melles DC, Van Leeuwen WB, Boelens HAM, Peeters JK, Verbrugh HA, Van Belkum A. Panton-Valentine Leukocidin Genes in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1174-1175.
45. Melo EC, Fortaleza CM. Case-case-control study of risk factors for nasopharyngeal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical-surgical intensive care unit. *Braz J Infect Dis.* 2009; 13(6): 398-402.

46. Menegotto FR, Picoli SU. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. RBAC. 2007; 39: 147-150.
47. Milheiriço C, Oliveira DC, Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Ag Chemother. 2007; 51(9): 3374–3377.
48. Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43: 399-406.
49. Moroney SM, Heller LC, Arbuckle J, Talavera M, Widen RH. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* and Panton-Valentine Leukocidin Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones. J Clin Microb. 2007; 45: 1019–1021.
50. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microb. 1991; 29: 2240-2244.
51. Nagaraju U, Bhat G, Kuruvila M, Pai GS, Jayalakshmi, Babu RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired pyoderma. Int J Dermatol. 2004; 43: 412-414.
52. Nascimento-Carvalho CM, Lyra TG, Alves NN, Caldas RM, Barberino MG. Resistance to Methicillin and Other Antimicrobials Among Community-Acquired and Nosocomial *Staphylococcus aureus* Strains in a Pediatric Teaching Hospital in Salvador, Northeast Brazil. Microbial Drug Resistance. 2008; 14: 129-131.
53. Nejmaa MB, Mastourib M, Jrada BBH, Noura M. Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Tunisia. Diagn Microb and Infect Dis. 2008 in press
54. Nunes JO, Passos DT. Gene *mecA* e Gene PVL em *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) em Animais [Internet]. Guaíba (RS): Universidade Luterana do Brasil, ULBRA. [cited 2010 june 15]. Available from: <http://guaiba.ulbra.tche.br/pesquisas/2007/artigos/biologia/209.pdf>
55. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'brien FG, et al. Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Micr. 2002; 40: 4289–4294.
56. 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 Chemother. 2002; 46: 2155–2161.
57. Patel M, Waites KB, Moser SA, Cloud GA, Hoesley CJ. Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance among Community and Hospital-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates. J Clin Micr. 2006; 44: 2481–2484.

58. Pereira VC, Martins A, Rugolo LMSS, Cunha MLRS. Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from the Neonatal and Pediatric Units of a Brazilian Teaching Hospital. *Clin Med Ped.* 2009; 3: 23–31.
59. Razera F, De Stefani S, Bonamigo RR, Olm GS, Dias CAG, Narvaez GA. CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. *An Bras Dermatol.* 2009; 84: 515-518.
60. Reddy P, Qi C, Zembower T, Noskin GA, Bolon M. Postpartum Mastitis and Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 298-301.
61. Reinert C, McCulloch JA, Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Type IV SCCmec Found in Decade Old Brazilian MRSA Isolates. *Braz J of Infect Dis.* 2008; 12(3): 213-216.
62. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS, et al. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Micr.* 2005; 43: 1985–1988.
63. Ricardo SB. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na Comunidade. *Prat Hosp.* 2004; 4(34): 131-134.
64. 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.
65. Rutland BE, Weese JS, Bolin C, Au J, Malani AN. Human-to-Dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 1328-1330.
66. Saïd-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W, et al. Differential Distribution and Expression of Pantón-Valentine Leucocidin among Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Micr.* 2005; 43: 3373–3379.
67. Saikia L, Nath R, Choudhury B, Sarkar M. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Assam. *Indian J Critic Care.* 2009; 13(3): 156-158.
68. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 131–139.
69. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43: 413-423.
70. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Leavitt A, Mekuzas Y, Hammer-Münz O, Schlesinger J, et al. Failure of Broth-Based Tests to Detect Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus in a Clinical Specimen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23: 348–351.

71. Stemper ME, Brady JM, Qutaishat SS, Borlaug G, Reed J, Reed KD, et al. Shift in *Staphylococcus aureus* Clone Linked to an Infected Tattoo. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1444-1446.

72. Stulberg DL, Penrod MA, Blatny RA. Common Bacterial Skin Infections. Amer Fam Phys. 2002; 66(1): 119-124.

73. Thabet L, Memmi M, Turki A, Messadi AA. The impact of fluoroquinolones use on antibiotic resistance in an intensive care burn department. Tunis Med. 2010 88(5): 297-300.

74. Thind P, Prakash SK, Wadhwa A, Garg VK, Pati B. Bacteriological profile of community-acquired pyodermas with special reference to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2010; 76: 572-4.

75. Thong KL, Junnie J, Liew FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibiograms and Molecular Subtypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Local Teaching Hospital, Malaysia. J Microbiol Biotechnol. 2009; 19(10): 1265–1270.

76. Turabelidze G, Lin M, Wolkoff B, Dodson D, Gladbach S, Zhu BP. Personal Hygiene and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 422-427.

77. Van Duijkeren E, Wolfhagen MJHM, Heck MEOC, Wannet WJB. Transmission of a Pantone-Valentine Leucocidin-Positive, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain between Humans and a Dog. J Clin Micr. 2005; 43: 6209–6211.

78. Voyich JM, Otto Michael, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, et al. Is Pantone-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? J Infect Dis. 2006; 194: 1761–1770

78. Wey SB, Cardo DM, Halker E, Carratu FP, Saes AC. Distribution and analysis of 8,268 nosocomial infections at the Hospital São Paulo: 1985 to 1989. Rev Hosp S Paulo Esc Paul Med. 1990; 1: 169-174.

79. Williams Reo. Healthy Carriage of *Staphylococcus aureus*: Its Prevalence And Importance. Bacteriol Rev. 1963; 27: 56-71.

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

81. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel Multiplex PCR Assay for Simultaneous Identification of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains USA300 and USA400 and Detection of

mecA and Panton-Valentine Leukocidin Genes, with Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Micr. 2008; 46: 1118–1122.

82. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Conly JM. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Chemother. 2009; 53: 531–540.

83. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Tan J, Conly JM. Coexistence of Panton-Valentine Leukocidin-Positive and -Negative Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA400 Sibling Strains in a Large Canadian Health-Care Region. J Infect Dis. 2008; 197: 195–204.

Anexos

ANEXO A
Questionário

- Identificação (Nome e RG Unesp): _____.
- Profissão (se aposentado, qual era sua profissão?): _____.
- Sexo () Feminino () Masculino Idade: _____ Tel. para contato: _____.
- Reside na Cidade de _____ na () Zona Rural () Zona Urbana
- Leve em consideração os últimos 12 meses para responder as questões abaixo:
1. Já teve alguma infecção anteriormente que necessitou de tratamento com antibiótico(s)? Qual(is) antibiótico(s) foi(ram) utilizado(s)?
() Não () Sim, _____.
 2. Nos últimos 12 meses teve algum dos tratamentos abaixo:
() Diálise () Cirurgia () Cateterismo () Drenagem de Abscesso
() Nenhum
 3. Nos últimos 12 meses foi admitido em alguma instituição abaixo?
() Clínica de repouso/reabilitação () Hospital (internado) () Asilo () Foi preso () Tiro de guerra () Time esportivo () Nenhuma
 4. Pratica algum esporte? Qual? _____.
 5. Faz uso de seringas de insulina? () Sim () Não.
 6. Faz uso de drogas ilícitas? () Sim, sempre na veia. () Sim, às vezes na veia.
() Sim, mas nunca na veia. () Não, nenhum tipo.
 7. Há quanto tempo apresenta a infecção (aproximadamente)? É de repetição?
_____.
 8. Utilizou ou está utilizando algum antibiótico? Se positivo, qual? Por quanto tempo?
() Não () Sim, _____.
 9. Trata de outra(s) doença(s), qual(is)? () Não () Sim, _____.
 10. Se diabetes: () Tipo I () Tipo II () Não
 11. Trauma precedente na lesão? Qual? (exemplo: picada de algum inseto)
_____.
 12. Mantém relações sexuais com pessoa do mesmo sexo? () Sim () Não
 13. Por gentileza, informe sua renda familiar (aproximadamente): _____.
 14. Apresentação clínica (diagnóstico): _____.
- Biopsia: () S () N Foto: () S () N

Obrigada pela colaboração!

ANEXO B**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em pesquisa científica**

Projeto de Pesquisa: “*Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana em CA-MRSA e Estafilococos Coagulase-Negativa isolados de pacientes da Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP*”.

O objetivo da pesquisa é verificar a presença das bactérias denominadas *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa, resistentes à oxacilina, um tipo de antibiótico, em pacientes com infecções de pele e tecidos moles na comunidade. Solicito seu consentimento para participar desta pesquisa, nos permitindo coletar uma amostra do local da infecção, através de um leve esfregaço com o swab (material similar a um cotonete destinado a pesquisa), e responder um questionário contendo dados de identificação e informações básicas referentes à sua saúde. Suas informações serão utilizadas exclusivamente pela pesquisadora, que manterá sigilo sobre sua identidade. A pesquisadora estará disponível para responder quaisquer perguntas e você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento. Tendo sido satisfatoriamente informado sobre a pesquisa “Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana em CA-MRSA e Estafilococos Coagulase-Negativa isolados de pacientes da Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP” sob responsabilidade de Mariana Fávero Bonesso, orientada pela professora Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha responsável pelo Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, e co-orientador Dr. Silvio Alencar Marques do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina da Unesp, declaro que concordo em participar da mesma, aceitando à coleta de material do sítio de infecção com swab e respondendo às perguntas apresentadas em questionário. Esclarecimentos adicionais poderão ser obtidos com a pesquisadora pelo telefone: 3811-6058.

Botucatu, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura da Pesquisadora

Nome por extenso:

Pesquisadora: _____

Sujeito da Pesquisa: _____

Endereço e telefone do pesquisador: Rua Capitão Andrade, 270, Bairro Alto, Botucatu-SP. CEP: 18601- 200; tel. (14) 8153-1632. Endereço e telefone da orientadora: Rua Carlos Guadanini, 2556. Altos do Paraíso, Botucatu-SP. CEP 18610-120; tel. (14) 3815-8272.

ANEXO C



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 13.018-970
Fones/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 04 de agosto de 2008

Of. 315/08-CEP

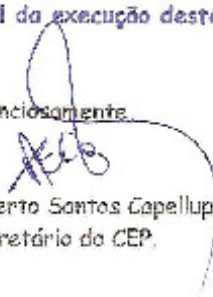
Ilustríssima Senhora
Profª Drª Maria de Lourdes R. S. Cunha
Departamento de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezada Drª Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana em CA-MRSA e estafilococos coagulase-negativa isoladas de pacientes da Dermatologia do HC-FMB-SP", a ser conduzido por Mariana Fávero Banesso, orientada Vossa Senhora, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 04/08/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.