

**Eliane Patricia Lino Pereira Franchi**

**“Caracterização da Resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*  
isolados de feridas de pacientes atendidos em unidades básicas de  
saúde da cidade de Botucatu”**

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

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: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Franchi, Eliane Patricia Lino Pereira.

Caracterização da resistência a oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de feridas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu / Eliane Patricia Lino Pereira Franchi. – Botucatu : [s. n.], 2011

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

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Capes: 21202010

1. Cuidados Primários de Saúde. 2. Estafilococos áureos. 3. Botucatu (SP)

Palavras-chave: Atenção primária à saúde; Fatores de risco; Resistência; *Staphylococcus*.

*Dedicatória*

---

## DEDICATÓRIA

*A Deus por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir a cada dia e conhecer todas as pessoas que citarei abaixo.*

*Em especial aos meus pais Benedito e Sônia, exemplos de força e dedicação, bases da minha formação, a quem devo a vida e tudo que me tornei, não bastaria um obrigado. A vocês, meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão e apoio constante nesta jornada. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante os momentos de ausência, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.*

*Amo vocês!*

*Ao meu irmão Willian pelo carinho, apoio e convivência. Que a finalização desse trabalho sirva de estímulo para sua nova fase. Sucesso! Amo você.*

*Ao meu esposo Flávio, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência, carinho, amor e apoio na realização desse sonho. Te amo muito!*

*A essa nova vida que está a caminho, transformando e proporcionando novo sentido à minha existência. E a quem, em palavras, não consigo expressar todo meu amor.*

*Aos meus grandes amigos Lucas e Gláudia pelo convívio, carinho, risos e incentivo.*

*Obrigado por tudo. Amo vocês!*

*"Pedi e vos será dado; buscai e achareis; batei e vos será aberto; pois todo o que pede recebe; o que busca acha e ao que bate se lhe abrirá" Mateus 7,7*

---

# *Agradecimientos*

---

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por permitir chegar até aqui e por tudo que sou.*

*À minha orientadora, Maria de Lourdes por acreditar e investir em mim, desde a iniciação, possibilitando consolidar meus conhecimentos sob sua supervisão e crescer profissionalmente. Minha especial admiração e gratidão.*

*Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Mariana, Patrícia, Valéria, Fabiana, Fláudia, Letícia, Carla, Luíza, Maria Raquel, Natália, Camila, Katherine, Taísa, Lígia, Adriano, Adilson, André, Jackson, Marcus, Danilo e Carlos, por contribuírem direta ou indiretamente.*

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

*Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, obrigada pelos esclarecimentos, apoio, solicitude e disponibilidade.*

*À Solange e Maíara sempre prontas para auxiliar e atender-nos.*

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

*Ao Professor Carlos Magno pela colaboração e pelas análises estatísticas que muito contribuíram nesse trabalho.*

*A Todos os funcionários das unidades básicas de saúde de Botucatu: enfermeiros, médicos, auxiliares e técnicos de enfermagem, agentes comunitários, assistentes administrativos, entre outros, que contribuíram para a realização deste trabalho.*

*A todos os pacientes que participaram deste estudo.*

---

*A toda minha família, pelo incentivo e amor concedidos. Em especial para Tia Pêlia, Tia Rosana, Tio Nandê, vó Aparecida, vó Antenor e Mariana.*

*Aos amigos de todas as épocas, impossível de listar todos, mas inesquecíveis e vitais.*

*A todas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para concretização desse trabalho.*

*Muito obrigada!*

*Epígrafe*

---



*"Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas ..."*  
*Luis Fernando Verissimo*

---

# Sumário



---

---

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                  | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                            | xiv    |
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                                            | xvii   |
| RESUMO.....                                                                                                                      | xix    |
| ABSTRACT.....                                                                                                                    | xxii   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                               | 1      |
| 1.1 <i>Staphylococcus</i> spp. ....                                                                                              | 1      |
| 1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina (MRSA).....                                                              | 3      |
| 1.3 Leucocidina Panton-Valentine.....                                                                                            | 7      |
| 1.4 Feridas e <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina (MRSA).....                                                   | 8      |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                                | 14     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                       | 16     |
| 3.1 Desenho do Estudo.....                                                                                                       | 16     |
| 3.2 Amostragem.....                                                                                                              | 16     |
| 3.3 Local de Estudo.....                                                                                                         | 17     |
| 3.4 Perfil dos Participantes.....                                                                                                | 19     |
| 3.5 Coleta e Processamento do material clínico.....                                                                              | 19     |
| 3.6 Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....                                                                              | 20     |
| 3.7 Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas “in vitro”- Técnica da difusão da droga em ágar ( Método Kirby- Bauer)..... | 21     |
| 3.8 Determinação da produção de $\beta$ -lactamase.....                                                                          | 22     |
| 3.9 Hiperprodução de $\beta$ -lactamase.....                                                                                     | 22     |
| 3.10 Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à meticilina.....                                                               | 23     |
| 3.10.1 Extração do ácido nucléico.....                                                                                           | 23     |
| 3.10.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR).....                                                                                 | 23     |
| 3.11 Detecção dos genes <i>lukS</i> -PV – <i>lukF</i> -PV da leucocidina Panton-Valentine.....                                   | 24     |
| 3.11.1 Extração do ácido nucléico.....                                                                                           | 24     |
| 3.11.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR).....                                                                                 | 24     |
| 3.12 Visualização dos produtos amplificados.....                                                                                 | 25     |
| 3.13 Determinação do tipo de <i>SCCmec</i> .....                                                                                 | 25     |
| 3.14 Análise Estatística.....                                                                                                    | 27     |
| 3.15 Análise de Fatores de Risco do hospedeiro para aquisição de <i>S. aureus</i> .....                                          | 28     |

---

---

---



---

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. RESULTADOS.....                                                                                                               | 30 |
| 4.1 Amostragem.....                                                                                                              | 30 |
| 4.2 Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. ....                                                                | 30 |
| 4.3 Perfil dos Participantes.....                                                                                                | 32 |
| 4.4 Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas “in vitro”- Técnica da difusão da droga em ágar ( Método Kirby- Bauer)..... | 34 |
| 4.5 Determinação da Produção de $\beta$ -lactamase.....                                                                          | 36 |
| 4.6 Hiperprodução de $\beta$ -lactamase.....                                                                                     | 37 |
| 4.7 Detecção do gene <i>mecA</i> de resistencia à oxacilina.....                                                                 | 38 |
| 4.8 Detecção dos genes <i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i> da Leucocidina Panton-Valentine..                                         | 41 |
| 4.9 Determinação do tipo de <i>SCCmec</i> .....                                                                                  | 41 |
| 4.10 Análise Estatística.....                                                                                                    | 47 |
| 4.11 Análise de Fatores de Risco do hospedeiro para aquisição de <i>S. aureus</i> ....                                           | 48 |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                                                                                | 51 |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                                                               | 64 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                               | 66 |
| ANEXO A: Questionário.....                                                                                                       | 80 |
| ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido.....                                                                         | 82 |
| ANEXO C: Aprovação do Comitê de Ética.....                                                                                       | 83 |

---



---

# *Lista de figuras*

---

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Áreas de abrangências das unidades de saúde do município de Botucatu.<br>Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Botucatu.....                                                                  | 19 |
| <b>Figura 2:</b> Número de pacientes com culturas positivas para o gênero <i>Staphylococcus</i> spp.....                                                                                                         | 31 |
| <b>Figura 3:</b> Distribuição de <i>S. aureus</i> e ECN isolados de feridas de pacientes atendidos nas UBSs do município de Botucatu.....                                                                        | 32 |
| <b>Figura 4:</b> Distribuição das espécies de ECN isoladas de feridas de pacientes atendidos nas UBSs do município de Botucatu.....                                                                              | 32 |
| <b>Figura 5:</b> Distribuição dos diagnósticos de feridas apresentados pelos pacientes atendidos pelas UBSs de Botucatu.....                                                                                     | 34 |
| <b>Figura 6:</b> Úlcera venosa de perna de paciente atendido pela USF Marajoara, da qual foi isolado MRSA SCCmec tipo IV.....                                                                                    | 34 |
| <b>Figura 7:</b> Úlcera venosa de perna de paciente atendido pela UBS Cohab I, da qual foi isolado MRSA com SCCmec tipo II.....                                                                                  | 35 |
| <b>Figura 8:</b> Distribuição de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a oxacilina pelo método de disco difusão em ágar com disco de oxacilina. OXA R= oxacilina resistente..... | 36 |
| <b>Figura 9:</b> Distribuição de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a cefoxitina pelo método de difusão em ágar com disco de cefoxitina. CFO R= cefoxitina resistente.....    | 36 |
| <b>Figura 10:</b> Produção de $\beta$ -lactamase em amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. provenientes de amostras coletadas de feridas.....                                                                    | 38 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 11:</b> Produção de $\beta$ -lactamase em amostras de <i>S. aureus</i> e ECN provenientes de amostras coletadas de feridas.....                                                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| <b>Figura 12:</b> Amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. positivas para presença do gene <i>mecA</i> de resistência.....                                                                                                                                                                                                                                                          | 39 |
| <b>Figura 13:</b> Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene <i>mecA</i> (533pb) pela técnica de PCR. Linhas 1-2; 5; 7-9; 11-13;16-17: amostras positivas para o gene <i>mecA</i> . Linhas 3;4;6;10;14-15: amostras negativas para o gene <i>mecA</i> . Linha 18: controle negativo (ATCC 25923). Linha 19: controle positivo (ATCC 33591). Linha 20: Ladder 100pb..... | 40 |
| <b>Figura 14:</b> Distribuição do gene <i>mecA</i> nas espécies de Estafilococos coagulase-negativa isoladas de feridas de pacientes atendidos nas UBSs de Botucatu.....                                                                                                                                                                                                          | 41 |
| <b>Figura 15:</b> Linhas 1, 5 e 7: amostras SCC <i>mec</i> tipo IV; Linhas: 2, 3, 4 e 6: amostras SCC <i>mec</i> tipo II; Linha 8: controle tipo II (PER34); Linhas 10 e 11 controles tipo III e IIIa (AN546, HU25); Linhas 12-15: controles IVa, IVb, IVc, IVd (JCSC 1968, JCSC978, MR 108, JCSC 4469); Linha 16: água; Linha 17: marcador de 100pb.....                         | 43 |
| <b>Figura 16:</b> Resistência a antimicrobianos de acordo com os tipos de SCC <i>mec</i> em MRSA.....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 44 |
| <b>Figura 17:</b> Resistência a antimicrobianos de acordo com os tipos de SCC <i>mec</i> em MRCoNS.....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 45 |
| <b>Figura 18:</b> Fluxograma dos resultados em relação à espécie, resistência a oxacilina, <i>mecA</i> e SCC <i>mec</i> de amostras isoladas de feridas de pacientes atendidos nas unidades básicas de saúde do município de Botucatu.....                                                                                                                                        | 48 |

# *Lista de Tabelas*

---



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mec A</i> .....                                                                                      | 25 |
| <b>Tabela 2:</b> Oligonucleotídeos para a detecção dos genes <i>lukS-PV</i> , <i>lukF-PV</i> .....                                                                 | 26 |
| <b>Tabela 3:</b> Oligonucleotídeos usados na caracterização do SCC <i>mec</i> em <i>S. aureus</i> .....                                                            | 27 |
| <b>Tabela 4:</b> Oligonucleotídeos para a detecção do SCC <i>mec</i> em ECN.....                                                                                   | 28 |
| <b>Tabela 5:</b> Resistência a drogas em amostras de <i>S. aureus</i> e Estafilococos coagulase-negativa.....                                                      | 37 |
| <b>Tabela 6:</b> Determinação da sensibilidade a oxacilina e cefoxitina em amostras de <i>S. aureus</i> por métodos genotípicos e fenotípicos.....                 | 40 |
| <b>Tabela 7:</b> Determinação da sensibilidade a oxacilina e cefoxitina em amostras de Estafilococos coagulase-negativa por métodos fenotípicos e genotípicos..... | 42 |
| <b>Tabela 8:</b> Frequência de cassetes cromossômicos encontrados em <i>S. aureus</i> relacionado com a UBS de origem.....                                         | 43 |
| <b>Tabela 9:</b> Frequência de cassetes cromossômicos encontrados em ECN relacionado com a UBS de origem.....                                                      | 45 |
| <b>Tabela 10:</b> Isolados de ECN e <i>S. aureus</i> relacionados com a UBS de origem.....                                                                         | 47 |
| <b>Tabela 11:</b> Frequência das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de acordo com o tipo de ferida.....                                               | 47 |
| <b>Tabela 12:</b> Comparação da presença do gene <i>mecA</i> com métodos fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina e cefoxitina por difusão de disco..... | 49 |
| <b>Tabela 13:</b> Análise univariada e multivariada dos fatores de risco para aquisição de <i>S. aureus</i> .....                                                  | 50 |

*Resumo*

---

## RESUMO

O gênero *Staphylococcus* está envolvido em infecções adquiridas tanto na comunidade como em hospitais, sobressaindo-se atualmente como um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções nosocomiais. Diante da importância do *S.aureus* como um dos microrganismos mais frequentemente isolados de infecções de pele e tecidos moles e a crescente disseminação dos *S. aureus* resistentes a oxacilina (MRSA), este estudo objetiva identificar a presença de MRSA em feridas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu, caracterizar o cassete cromossômico *mec* e identificar fatores de risco para aquisição de *S aureus* e MRSA. Foram incluídas no estudo 126 amostras isoladas de 107 pacientes atendidos no período de março de 2010 à fevereiro de 2011. As amostras foram submetidas à identificação e detecção de resistência a oxacilina pelo método de difusão com disco de oxacilina e cefoxitina, penicilina, levofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, sulfametazol/Trimetropim, tigeciclina, ácido fusídico, quinupristina/dalfopristina, linezolida e vancomicina. Foi realizada a caracterização do SCC*mec* por PCR multiplex nas amostras de *S. aureus* com gene *mecA*. Foi investigada a presença dos genes codificadores da Leucocidina Pantón-Valentine (PVL). As amostras de *Staphylococcus* spp. também foram submetidas detecção de produção de  $\beta$ -lactamase. Das 126 amostras estudadas, 73(58%) foram identificadas como gênero *Staphylococcus* spp., sendo 49/73(67,1%) isolados *S. aureus* e 24/73(32,9%) estafilococos coagulase-negativa (ECN). A produção de  $\beta$ -lactamase foi positiva em 65/73(89%) das amostras de *Staphylococcus* spp. Foi encontrado 7/49(14,2%) isolados de *S. aureus* e 13/24(54,1%) isolados de ECN com presença do gene *mec A*. Dentre os MRSA, 4/7(57,2%) isolados foram de SCC*mec* tipo II e 3/7(42,8%) isolados SCC*mec* tipo IV e nos ECN resistentes

---

(MRCoNS), foram 7/13(53,8%) isolados SCCmec tipo III, 3/13(23%) isolados tipo IV e 3/13(23%) não foram tipadas pelo protocolo utilizado. Os genes codificadores da leucocidina Panton-Valentine não foram encontrados nas amostras do estudo. O uso de Benzilpenicilina foi um fator de risco para aquisição de *S. aureus* [OR: 2,88 (1,25-6,64) p=0,01].

---

*Abstract*



## ABSTRACT

The genus *Staphylococcus* is involved in both community and hospital-acquired infections, currently standing out as major clinical and epidemiological problems in nosocomial infections. Given the importance of *S. aureus* as one of the most frequently microorganism isolated from skin and soft tissue infections and the increasing spread of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), the aims of this study were to identify the presence of MRSA in wounds of patients treated at basic health units in Botucatu, characterize the cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and identify risk factors for acquisition of *S. aureus* and MRSA. The study included 126 isolates from 107 patients treated from March 2010 to February 2011. The samples were identified and the disk diffusion method with cefoxitin and oxacillin disks was carried out in order to detect the resistance to oxacillin. The disk diffusion method was also carried out to set the susceptibility profile for the following antibiotics: penicillin, levofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tigecycline, fusidic acid, quinupristin/dalfopristin, linezolid and vancomycin. *mecA* positive samples were submitted to SCC*mec* characterization using multiplex PCR. We also investigated the presence of genes encoding Panton-Valentine Leukocidin (PVL) as far as the  $\beta$ -lactamase production. From the 126 samples studied, 73 (58%) were identified as genus *Staphylococcus* spp., and 49/73 (67.1%) isolates were identified as *S. aureus* and 24/73 (32.9%) as coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS). The  $\beta$ -lactamase production was positive in 65/73 (89%) samples of *Staphylococcus* spp. The *mecA* gene was detected in 7/49 (14.2%) isolates of *S. aureus* and 13/24 (54.1%) isolates of CoNS. Among MRSA, 4/7 (57.2%) isolates were SCC*mec* type II and 3/7 (42.8%) were SCC*mec* type IV. In methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MRCoNS) 7/13 (53.8%) isolates were SCC*mec* type III, 3/13 (23%) type IV and 3/13

---

(23%) were not characterized by the protocol used. The genes encoding Pantone-Valentine Leukocidin were not detected in the samples of the study. The use of benzylpenicillin was considered a risk factor for acquisition of *S. aureus* [OR: 2.88 (1.25 to 6.64)  $p = 0.01$ ].

---

# *Introdução*

---



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* está amplamente distribuído na natureza, sendo principalmente encontrado na pele e mucosas de mamíferos e aves.<sup>1</sup> Foi Rosenbach em 1884 que propôs o gênero, inserido-o na família Micrococcaceae. Recentemente, estudos avaliando perfis de ácidos graxos, composição da parede bacteriana, e principalmente, biologia molecular, utilizando o RNA ribossômico 16S, incluiu o gênero *Staphylococcus* em uma nova família, a Staphylococcaceae.<sup>2</sup>

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis, não fotossintéticos, não esporulados, catalase positivos e capazes de crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio. São mesófilos, desenvolvendo em temperaturas de 7 a 48°C, com temperatura ótima a 37°C e pH de 4 a 10.<sup>1</sup>

São responsáveis por um grande número de infecções bacterianas no homem, sendo dividido em dois grandes grupos com base na produção da enzima coagulase. O primeiro grupo, conhecido como *Staphylococcus* coagulase-positiva, é representado, principalmente, pelo *Staphylococcus aureus*, e em animais também há o *S. schleiferi* subespécie *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. delphini*.<sup>3</sup>

O segundo grupo, chamado estafilococos coagulase-negativa (ECN), é compreendido por várias espécies: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. xylosus*, entre outros.<sup>4</sup> No momento estão descritas 45 espécies e 24 subespécies dentro do gênero.<sup>3</sup>

O *Staphylococcus aureus* tem destaque dentro do gênero, estando envolvido em infecções adquiridas tanto na comunidade como em hospitais, sobressaindo-se atualmente como um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções nosocomiais. Evidencia-se por sua patogenicidade e alta frequência, permitindo que este

---

agente seja capaz de produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em sadios, por sua fácil disseminação, enorme capacidade de adaptação ao ambiente e resistência à antibióticos.<sup>5</sup>

*Staphylococcus* spp. são usualmente comensais das fossas nasais, pele e até intestinos de indivíduos sãos.<sup>6</sup> Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização por *S. aureus*, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais.<sup>7-8</sup> Por isso, as infecções freqüentemente resultam da introdução dessas cepas em locais previamente estéreis após um trauma, abrasões de pele e mucosas ou durante procedimentos cirúrgicos.<sup>9-10</sup>

Quando um indivíduo carrega a bactéria potencialmente infectante em sua microbiota, este pode ter dois desfechos: desenvolver o quadro clínico de infecção com os sinais e sintomas característicos, ou continuarem assintomáticos, sendo conhecidos como portadores sãos, colonizados e sem sinais e sintomas.<sup>11</sup>

Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contato. Assim, principalmente em hospitais, o hospedeiro assintomático pode ser um paciente, um visitante, ou mesmo um profissional de saúde.<sup>11</sup>

Os ECN por muito tempo foram considerados apenas como comensais de pele, inofensivos e descartados como colonizantes ou contaminantes quando encontrados em culturas de amostras clínicas. Entretanto o seu papel como patógeno e sua incidência cada vez maior tem sido reconhecida e estudado nos últimos anos. Eles são a causa mais comum de bacteremia relacionada com dispositivos de longa permanência.<sup>12</sup> A maioria destas infecções são adquiridas no hospital, freqüentemente causadas por cepas que são transmitidas entre os pacientes hospitalizados. Outras infecções importantes devido aos

---

ECN incluem infecções do sistema nervoso central, endocardite na valva nativa ou prótese, infecções do trato urinário, e endoftalmite. Tratamento intravenoso de infecções sistêmicas geralmente é necessário porque os ECN tornaram-se cada vez mais resistente a múltiplos antibióticos.<sup>13</sup>

A crescente incidência de infecções causadas pelos ECN pode ser atribuída à sua capacidade de produzir biofilme. O crescente uso de próteses, cateteres intravasculares, e outras tecnologias invasivas em pacientes, graves, imunossuprimidos, e nos extremos da vida coloca os ECN como um dos principais patógenos hospitalares, resultando em considerável morbidade e excesso de despesas médicas.<sup>13</sup>

## **1.2 *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA)**

A descoberta dos antimicrobianos no passado produziu uma acentuada redução na mortalidade por inúmeras doenças infecciosas. A administração dos antibióticos à população humana e seu uso com outras finalidades favoreceram e ainda favorecem a seleção de microrganismos resistentes, assim muitos antibióticos tem perdido sua eficácia.

A introdução da metilina,  $\beta$ -lactâmico sintético resistente a ação das beta-lactamases, foi logo seguida pelo aparecimento de cepas de *Staphylococcus aureus* metilina- resistentes (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) já na década de 60. O primeiro relato de MRSA foi descrito por Jevons et al.<sup>14</sup> em 1961. Contudo, a maior frequência de relatos de MRSA como patógeno em infecções hospitalares deu-se a partir do início dos anos 80, sendo responsável atualmente por níveis endêmicos significativos em muitas instituições, quando não epidêmicos.<sup>15</sup>

Os estafilococos resistentes à metilina, análogo da oxacilina, são resistentes a toda a classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos disponíveis, dificultando o tratamento de

---

infecções causadas por estes microrganismos.<sup>16</sup> A vancomicina é considerada a droga de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas graves, especialmente as causadas por MRSA. Entretanto em 1997 foi descrito pelo Professor Keich Hiramatsu, da Universidade de Jutendo, Japão, uma cepa com resistência intermediária à vancomicina (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* - VISA) isolada de uma ferida cirúrgica de um garoto de 4 meses.<sup>17</sup> Em 2002 foi encontrado, nos EUA, o primeiro isolado clínico de cepa VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), com concentração inibitória mínima (CIM) de 8 µg/ml.<sup>18</sup> Outras cepas resistentes continuam surgindo como as relatadas no Japão, França, Reino Unido e Alemanha. A maioria desses isolados parece ter se desenvolvido a partir de infecções por MRSA pré-existentes.<sup>19-20</sup>

A marcante capacidade dos MRSA em adquirir genes de resistência a antimicrobianos dificulta cada dia mais o tratamento das infecções causadas por esse patógeno. A alta mortalidade e morbidade ocasionada por esse agente associada aos altos custos financeiros, a falta de investimentos e a falta de sucesso na produção de novas drogas antimicrobianas pela indústria farmacêutica, junto à obsolescência intrínseca por resistência são fatores importantes que impedem o tratamento.<sup>21</sup>

As infecções causadas por MRSA resultam em maior duração de internação, maior cuidado para não infectar pacientes sãos, maior morbidade e mortalidade comparado com as causadas por MSSA (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*).<sup>22-25</sup>

Os estafilococos exibem sensibilidade variável a muitos agentes antimicrobianos. A resistência pode ser dividida em várias categorias: (1) a produção de  $\beta$ -lactamase, codificada por genes plasmidiais, é comum e torna os microrganismos

---

resistentes a muitas penicilinas (penicilina G, ampicilina, ticarcilina e fármacos semelhantes). Os plasmídios são transmitidos por transdução e provável conjugação.<sup>26</sup>

(2) A resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp é primariamente mediada pelo gene *mecA*, que codifica uma proteína que apresenta afinidade reduzida por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (*penicillin-binding protein 2a* – PBP2a).<sup>27</sup>

O alvo de atuação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são as chamadas proteínas ligadoras de penicilina (*penicillin binding protein* - PBP), proteínas de membrana diretamente envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana. Os  $\beta$ -lactâmicos, que interagem com as PBP's, impedem a formação completa da camada de peptidoglicano da parede celular, desencadeando a morte bacteriana. Porém, na presença do gene *mecA*, ocorrem alterações das proteínas de ligação através da codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP2a que apresenta baixa afinidade aos  $\beta$ -lactâmicos. Portanto, no mutante resistente à meticilina (MRSA) não ocorrerá inibição da síntese da parede bacteriana, uma vez que a PBP2a funciona como uma PBP substituta.<sup>28-29</sup>

Nos últimos anos, surgiu o *S. aureus* resistente à meticilina associado à comunidade (Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* - CA-MRSA). O CA-MRSA é um patógeno potencialmente emergente que vem apresentando frequência crescente de isolados.<sup>30-31</sup> Os pacientes acometidos pelo CA-MRSA não tiveram internação em hospitais no ano anterior à infecção, nem foram submetidos a procedimentos médicos como diálise, cirurgia ou cateter, fatos muito comuns em infecção por MRSA.<sup>32-34</sup>

Embora as infecções por CA-MRSA sejam geralmente cutâneas, doenças invasivas como bacteremias, endocardites, osteomelites e pneumonias já foram

---

descritas. Surtos de infecções hospitalares por cepas comunitárias também já foram relatados.<sup>35-36</sup>

Enquanto o MRSA hospitalar (Healthcare-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* - HA-MRSA) se caracteriza por uma ampla resistência a diversos antibióticos, as cepas CA-MRSA mostram uma sensibilidade (entre 85% e 100%) a drogas, como clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametaxazol/trimetoprim e vancomicina, mostrando-se resistente apenas à oxacilina e a outros beta-lactâmicos.<sup>33-34</sup>

Os CA-MRSA, são facilmente transmitidos não somente entre familiares, mas também em grande escala na comunidade, como prisões, escolas e times de esportes. O contato pele-pele envolvendo abrasões e contato indireto com objetos contaminados como toalhas, lençóis, equipamentos de esportes parecem representar um modo de transmissão. Tem se isolado cepas de CA-MRSA, principalmente de pacientes admitidos em hospitais, esses certamente representam a ponta do iceberg da população inteira de portadores de CA-MRSA.<sup>37</sup>

O gene *mecA* é carregado em um elemento genético móvel chamado cassette cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Esse cassette possui dois componentes genéticos em sua estrutura. O primeiro é o complexo *mec*, composto pela IS431, o gene *mecA* e seus reguladores: um operon com um repressor (*mecI*) e um transdutor de sinal (*mecRI*), assim o complexo *mec*, atualmente, é formado por seis classes: classe A, B, C1, C2, D e E. O segundo é o complexo *ccr*, com três genes *ccr* filogeneticamente distintos classificados como: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, responsáveis pela transposição do SCC*mec*.<sup>38-39</sup>

Atualmente há descritos na literatura, 11 tipos de SCC*mec*, classificados como SCC*mec* tipo I (complexo gene *mec* classe B e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo II (complexo

---

gene *mec* classe A e *ccrA2B2*), SCC*mec* tipo III (complexo gene *mec* classe A e *ccrA3B3*), SCC*mec* tipo IV (complexo gene *mec* classe B e *ccrA2B2*), SCC*mec* tipo V (complexo gene *mec* classe C2 e *ccrC*), SCC*mec* tipo VI (complexo gene *mec* classe B e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo VII (complexo gene *mec* classe C1 e *ccrC*), SCC*mec* tipo VIII (complexo gene *mec* classe A e *ccrA4B4*), SCC*mec* tipo IX (complexo gene *mec* classe C2 e *ccrA1B1*), SCC*mec* tipo X (complexo gene *mec* classe C1 e *ccrA1B6*), SCC*mec* tipo XI (complexo gene *mec* classe E e *ccrA1B3*) (IWG-SCC). A região restante do SCC*mec* é chamada de região J (Joining region), que possui componentes não essenciais ao cassete e que podem carrear determinantes de resistência antimicrobiana adicionais.<sup>39</sup>

A diferença entre os perfis de resistência das cepas de HA-MRSA e CA-MRSA parece ser explicado pelo tamanho e distribuição dos SCC*mec*. Entre os cinco tipos mais comuns de SCC*mec* (I, II, III, IV e V), somente os tipos I, II e III são encontrados em cepas HA-MRSA, enquanto que os tipos IV e V podem ser observados em cepas CA-MRSA, nas quais o tipo IV é menor e, provavelmente, facilita a perda dos genes de resistência a diversos antibióticos, conservando- a para  $\beta$ -lactâmicos.<sup>33-34</sup>

### 1.3 Leucocidina Pantón-Valentine

A Leucocidina Pantón-Valentine (PVL) é uma leucocidina bi-componente, composta por duas proteínas distintas secretadas independentemente e de ações sinérgicas. É uma toxina citolítica do *S. aureus*, que atua formando poros em células fagocíticas, assim interferindo nas defesas imunológicas e causando grande dano tecidual.<sup>40</sup>

As duas proteínas que compõem a PVL são denominadas como subunidades de classe S (31-32 kDa) e de classe F (36-38 kDa). Um componente da classe S reconhece

---

um receptor celular, o que não produz resposta da célula, mas permite que membros da classe F, junto com componentes da classe S, associam-se em complexos octaméricos que acionam atividades biológicas. A consecutiva associação com a membrana da célula alvo é rapidamente seguida pela ativação de canais de cálcio e pela formação de poros transmembrânicos que são permeáveis a cátions monovalentes.<sup>40-41</sup>

Após o primeiro relato de *S. aureus* produtores de PVL, outros casos foram descritos na Holanda, França, Suíça e Inglaterra, associados a cepas de CA-MRSA.<sup>42</sup> A presença dos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, que codificam a PVL é considerado um fator de virulência associado a infecções de pele primárias severas e pneumonias necrotizantes, e um marcador genético do CA-MRSA.<sup>33-34</sup>

Acredita-se que o fato do CA-MRSA expressar toxinas Leucocidina Panton Valentine torna as infecções mais graves, o que em ambientes hospitalares, em pacientes com várias comorbidades, teria um efeito indesejável.<sup>43</sup>

#### **1.4 Feridas e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)**

No Brasil, as feridas acometem a população de forma geral, independente de sexo, idade ou etnia, determinando um alto índice de pessoas com alterações na integridade da pele, constituindo assim, um sério problema de saúde pública. Estima-se que em países desenvolvidos, 1 a 2% da população tiveram alguma experiência com ferida crônica durante sua vida.<sup>44</sup> Nos Estados Unidos, calcula-se que o custo anual no tratamento de úlceras venosa seja de \$1.9-2.5 bilhões,<sup>45</sup> e o custo global permaneça entre \$13 a 15 bilhões.<sup>46</sup> Assim, o surgimento de feridas onera os gastos públicos e prejudica a qualidade de vida da população.<sup>47</sup>

---



Podemos classificar as feridas como agudas ou crônicas. As feridas agudas são resultantes de cirurgias e traumas, e geralmente cicatrizam dentro de um prazo previsível.<sup>48</sup>

Ainda não há concordância na definição de ferida crônica. Alguns autores definem ferida crônica quando não cicatrizam no período de 4 a 6 semanas.<sup>49-50</sup> Também pode ser definida como a não cura em até 3 meses. Independente do tempo levado para cura da ferida é considerada ferida crônica quando há falha no processo de cicatrização.<sup>51</sup>

O processo de cicatrização normal da ferida é um evento fisiológico complexo que depende de interações entre os queratinócitos epidérmicos, fibroblastos dérmicos, células de Langerhans, células endoteliais e fibroblastos, coordenados por interações entre via celular complexa / célula e célula / matriz. Esse processo é alterado nas feridas crônicas, que apresentam-se com inflamação prolongada, com uma matriz defeituosa, e insuficiência de reepitelização.<sup>52</sup> A etiologia das feridas crônicas não está clara, acredita-se ser multifatorial.

A ferida crônica é colonizada por várias espécies de bactérias que depois de estabelecida, muitos destes microrganismos persistem na ferida.<sup>53</sup> Em geral, são colonizadas por bactérias da pele ao redor da ferida, do ambiente local ou fontes endógenas do próprio pacientes ou de outros indivíduos.<sup>54</sup>

As feridas crônicas podem apresentar-se em um desses estados: colonização, colonização crítica e infecção. A colonização é definida como a presença de proliferação bacteriana sem uma perceptível resposta do hospedeiro. Uma carga bacteriana maior que  $10^5$  UFC/g no tecido pode impedir a cicatrização da ferida, entretanto, este limiar pode ser alterado dependendo do poder de resposta imune do hospedeiro, do número e espécies de bactérias presentes no leito.<sup>55</sup> Relata-se que a colonização possa ter seu lado benéfico, apressando a cicatrização. Tem se proposto que

---

a inflamação possa aumentar a perfusão do leito da ferida, ocasionando a cura mais rápida.<sup>56</sup>

A definição de colonização crítica é controversa, não havendo consenso entre os pesquisadores. A colonização crítica é caracterizada pelo aumento da carga bacteriana, sem os sinais da infecção, podendo a ferida não cicatrizar, persistindo com uma inflamação crônica.<sup>55</sup> Os sinais de colonização crítica são atrofia, deteriorização e descoloração do tecido de granulação para vermelho escuro ou cinza, tecido friável, aumento do exsudato.<sup>57</sup>

A transição para infecção ocorre quando a proliferação bacteriana supera a resposta imune do hospedeiro.<sup>58</sup> Vários fatores determinam a transição de colonização para infecção, como a carga bacteriana do indivíduo, a virulência dos microrganismos, a ação sinérgica de diferentes espécies bacterianas, e a habilidade do hospedeiro em montar uma resposta imune eficaz.<sup>59</sup>

Algumas condições podem alterar a eficácia do sistema imune e aumentar o risco de transição para infecção, como o diabetes *melittus*, a desnutrição, uso prolongado de esteróides, obesidade e idade avançada e características da ferida como baixa perfusão, e presença de necrose, corpo estranho e exsudato.<sup>60</sup>

A presença de bactérias na ferida atraem leucócitos, aumentando a concentração de proteases e causando alta oxidação do ambiente. As enzimas antioxidantes produzidas, tais como mieloperoxidase, junto a leucócitos polimorfonucleares, são essenciais para matar as bactérias, e têm uma atividade proporcional ao oxigênio dentro do ambiente da ferida. A pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) em nível de 25 mmHg gera superóxidos eficazes na morte de bactérias.<sup>61</sup> Estudos experimentais em humanos têm documentado que mesmo as reduções moderadas nos níveis de oxigênio nos tecidos, como resultado de isquemia temporária (tal como em hipotermia durante a cirurgia),

---

aumenta o risco de infecção.<sup>62-63</sup> Assim durante os períodos de isquemia em feridas crônicas, a capacidade de matar bactérias diminui e a carga bacteriana aumenta.

Associado a importância dos estafilococos resistentes à oxacilina está o fato de um dos principais locais de colonização e infecção dessas bactérias ser a pele e tecidos moles.<sup>37,64</sup> Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local.<sup>65-66</sup>

Egido et al.<sup>67</sup> no período de um ano avaliaram 16 casos de abscessos piogênicos múltiplos, e destes 10(62,5%) doentes possuíam como agente causal o *S. aureus* adquirido na comunidade. Aizen et al.<sup>68</sup> avaliaram os fatores de riscos associados a colonização por MRSA em pacientes geriátricos de um hospital de reabilitação. Dos 337 pacientes admitidos em um período de seis meses, 24(7,1%) foram isolados MRSA, desses 23(95,8%) foram recentemente (hospitalização anterior) identificados como portadores de MRSA. Os fatores de riscos associados à colonização por MRSA foram presença de traqueostomia, insuficiência renal, uso prévio de quinolonas a hospitalização.

Braga et al.<sup>69</sup> com o propósito de avaliarem os fatores de riscos intrínsecos e extrínsecos que favorecem a colonização/infecção de úlceras de pressão (UP) por bactérias multirresistentes, realizaram um estudo de coorte com 85 pacientes internados em um hospital, encontrando 67% desses pacientes colonizados e destes 80% por *S. aureus*. Como fatores de riscos foram encontrados uso de  $\geq 2$  antibióticos,  $\geq 2$  procedimentos invasivos, traqueostomia,  $\geq 30$  dias de internação e  $\geq 60$  anos. O estudo concluiu que a frequência elevada de patógenos multirresistentes a antibióticos em úlceras de pressão está associada ao uso de antibióticos entre outros fatores de risco. Além da associação com infecção local, observou-se a possibilidade da UP representar a fonte de sepse por *S. aureus*.

---

*S. aureus* são um dos patógenos mais freqüentemente encontrados em pacientes diabéticos com úlceras infectadas nos pés, em estudo realizado por Carvalho et al.<sup>70</sup> Os autores encontraram 43% de *S. aureus* e 11,6% eram MRSA. Goldstein et al.<sup>71</sup> em estudo também com pacientes diabéticos não hospitalizados com úlceras infectadas, isolaram predominantemente, *S. aureus* em 76% dos pacientes, e destes 20% eram cepas de MRSA.

As feridas crônicas representam um problema de saúde pública, mas infelizmente, é negligenciado, resultando em sofrimento e incapacidade para os pacientes, perda potencial de capacidade de trabalho, reduzindo a qualidade de vida e sobrecarregando o serviço público de saúde.<sup>72</sup>

Este estudo se justifica mediante a importância do *S. aureus* como um dos microrganismos mais freqüentemente isolados em feridas,<sup>69-70,73</sup> associado ao grande número de pessoas acometidas por essas alterações de pele e a crescente disseminação dos *S. aureus* resistentes á oxacilina (MRSA), o que dificulta o tratamento, aumenta custos e causa grande preocupação.

---

*Objetivos*

---

## 2. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de *Staphylococcus* spp., MRSA e os fatores de risco para aquisição destes, em feridas de pacientes atendidos pelas unidades básicas de saúde do município de Botucatu.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar amostras de *Staphylococcus* spp. em feridas de pacientes atendidos nas unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu.
  - Detectar a produção de  $\beta$ -lactamase nas amostras isoladas de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa.
  - Determinar a sensibilidade às drogas pelo método de disco difusão.
  - Detectar a presença do gene *mecA* de resistência à oxacilina.
  - Identificar a presença dos genes *lukS*-PV – *lukF*-PV da leucocidina Pantón-Valentine nas amostras isoladas de *Staphylococcus* spp.
  - Caracterizar o SCC*mec* das amostras de MRSA e MRCoNS (Methicillin resistant coagulase negative staphylococci), positivas para o gene *mecA*.
  - Determinar os fatores de risco para aquisição de *S. aureus* e MRSA.
-

# *Material e Método*

---

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo de delineamento observacional e transversal com o objetivo de observar a prevalência de MRSA em amostras coletadas de feridas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde do município de Botucatu.

#### **3.2 Amostragem**

O estudo foi realizado com pacientes portadores de feridas atendidos em 17 Unidades Básicas de Saúde (UBS) da cidade de Botucatu/SP.

**Critério de inclusão:** foram incluídos no estudo todos os casos existentes e novos de feridas, colonizadas ou infectadas, crônicas ou agudas, de todas as etiologias, atendidos no período de um ano.

**Critério de exclusão:** foram excluídos do estudo aqueles pacientes que relataram hospitalização e/ou cirurgia durante os 12 meses anteriores à coleta; que tiveram relato de cateteres percutâneos, próteses, ou de outros artigos e procedimentos invasivos no momento da coleta ou nos últimos 12 meses que a antecederam. Portanto foram excluídas as feridas de etiologia cirúrgica, no qual o procedimento cirúrgico ocorreu no período de até um ano antes da coleta.

Foram consideradas feridas crônicas aquelas com tempo de início maior que 4 semanas e o inverso como feridas agudas.<sup>49,74</sup>

Para a diferenciação entre ferida colonizada e ferida infectada, foi utilizada a observação dos sinais e sintomas clínicos de infecção. Sendo caracterizado como ferida infectada aquela que apresenta ao menos dois desses sinais: febre, eritema (rubor), edema (tumor), dor, calor local e aumento de secreção purulenta.<sup>54</sup> A ausência desses sinais foi caracterizado como colonização.

---

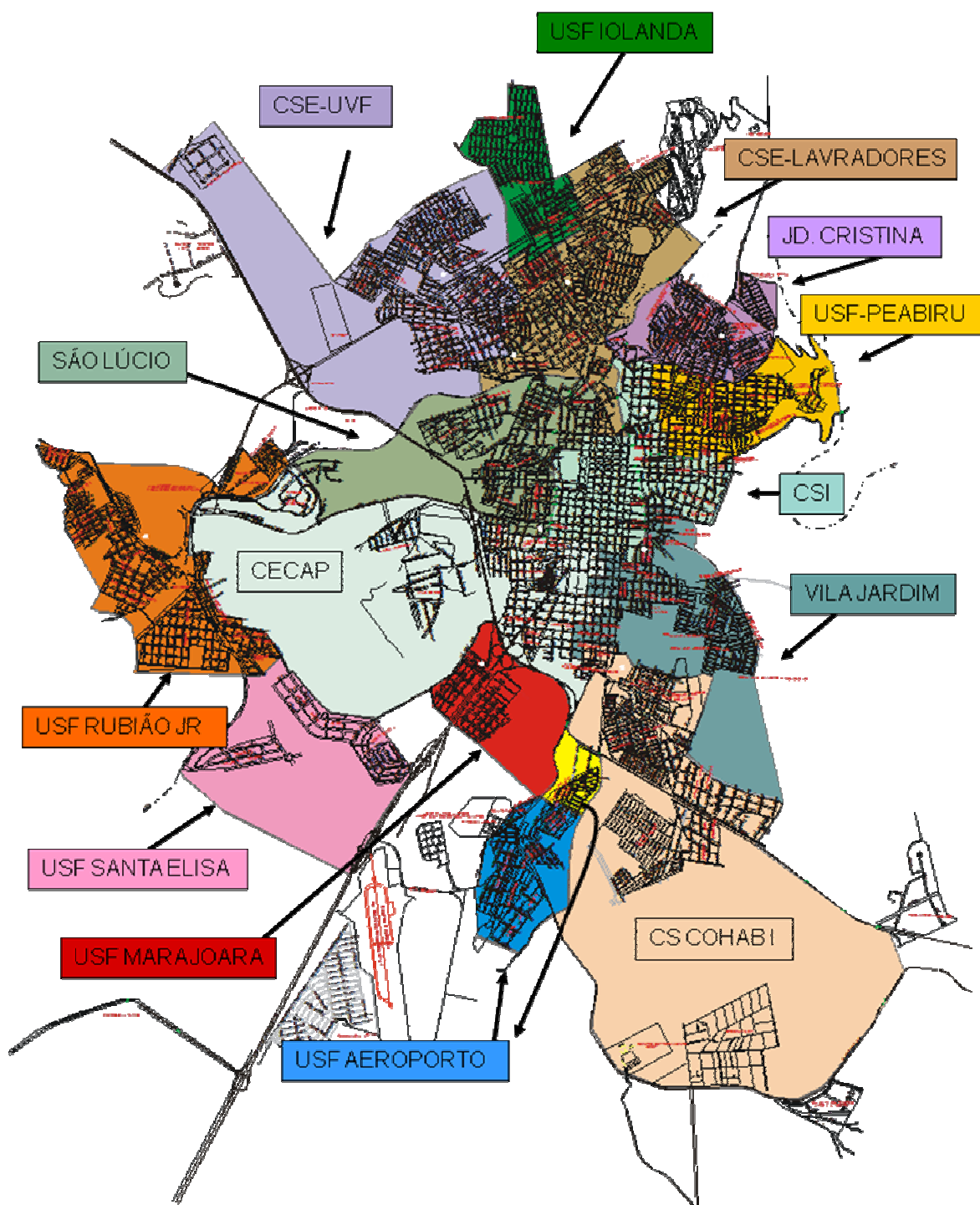


### **3.3 Local de estudo**

As coletas das amostras ocorreram nas 17 unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu (**Figura 1**). De acordo com o último censo, o município de Botucatu apresenta 122.659 habitantes.<sup>75</sup>

Unidades básicas de saúde:

- Centro de Saúde Cohab I
  - Centro de Saúde São Lúcio
  - Centro de Saúde Vila Jardim
  - Policlínica CECAP
  - Policlínica CSI
  - Policlínica Jardim Cristina
  - Unidade Saúde da Família Rubião Júnior (rural e urbana)
  - Unidade Saúde da Família Jardim Iolanda
  - Unidade Saúde da Família Marajoara
  - Unidade Saúde da Família Vitoriana
  - Unidade Saúde da Família Peabirú
  - Unidade Saúde da Família Aeroporto
  - Unidade Saúde da Família César Neto
  - Unidade Saúde da Família Santa Elisa
  - Unidade Saúde da Família Real Park
  - Centro de Saúde Escola – Vila dos Lavradores
  - Centro de Saúde Escola – Vila Ferroviária
-



**Figura 1:** Áreas de abrangências das unidades de saúde do município de Botucatu.  
Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Botucatu.

### **3.4 Perfil dos Participantes**

Foi preenchido um questionário (Anexo 1) para cada paciente estudado que foi previamente explicado ao participante, ficando o pesquisador disponível para esclarecimento das dúvidas. Esse questionário contém questões referentes aos dados pessoais: sexo, idade, escolaridade, ocupação; referentes às condições socioeconômicas: renda familiar, moradia, saneamento básico, admissão em instituições públicas, prática esportiva, uso de drogas ilícitas e lícitas e animal de estimação; referentes ao histórico de saúde e da (s) ferida(s): infecções prévias, origem da lesão, tempo e evolução da ferida, comorbidades, uso de antibióticos, diagnóstico microbiológico, internações hospitalares (admissão para ocupar um leito hospitalar por um período igual ou maior que 24 horas<sup>76</sup>). O questionário também inclui uma parte que foi preenchida pelo pesquisador, através da observação da lesão do paciente, que abrange questões como tipo da lesão, sítio anatômico, tamanho e aspecto/descrição da ferida e sinais/sintomas característicos de infecção. Para maiores esclarecimentos, também foi realizada consulta ao prontuário do paciente participante, com o propósito de buscar as informações, que não fossem conseguidas através do questionário, e diagnóstico da ferida e comorbidades. Para maior ilustração, também foi pedido à autorização do participante para fotografar a lesão.

### **3.5 Coleta e Processamento do Material Clínico**

Primeiramente, todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, procedimentos de coleta, e concordando participar, somente após a assinatura do termo de consentimento informado (Anexo 2) e preenchimento do questionário (Anexo1), é que foi iniciada a coleta.

---

Anterior a coleta do material, o curativo foi removido e realizado a limpeza da ferida com soro fisiológico morno ( $\pm 37.5^{\circ}\text{C}$ ) através da técnica de irrigação sobre pressão com uma seringa de 20 ml e agulha de calibre 25x8 – 21G, gerando uma pressão de 13,5 psi (libras/polegadas<sup>2</sup>) de acordo com resultados obtidos por Martins.<sup>77</sup>

Após a completa limpeza da ferida, foi utilizado um “swab” com alginato de cálcio estéril e umedecido em sua extremidade com soro fisiológico a 0.9%, para pressionar 1cm<sup>2</sup> da área da ferida por 5 segundos para que haja expressão do fluido do tecido.<sup>78</sup> Em seguida, o “swab” foi depositado no interior de um recipiente, que o acompanha, contendo meio de transporte “stuart”, que tem como objetivo preservar as bactérias.

Após a coleta, os materiais foram imediatamente encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, para realização de semeadura em placas contendo Ágar Baird-Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 24 à 48 horas as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos microrganismos isolados.

### **3.6 Identificação de *Staphylococcus* spp.**

Obedecendo as etapas de identificação microbiológica as colônias foram submetidas à coloração de Gram objetivando determinar sua pureza e observar sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação das características das colônias, os isolados foram submetidas às provas de catalase e coagulase.<sup>79</sup>

---

### 3.7 Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas “*in vitro*”- Técnica da difusão da droga em ágar ( Método Kirby- Bauer)

O teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas foi realizado pela técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>80</sup> Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de Mac Farland. Os discos utilizados foram de oxacilina (1µg), cefoxitina (30 µg), eritromicina (30µg), vancomicina (30µg), clindamicina (2µg), levofloxacina(5µg), penicilina G(10un), gentamicina (10µg), sulfametazol/Trimetropim (25µg), linezolida (30µg), quinupristina/dalfopristina (15µg), tigeciclina (15µg) e ácido Fusídico (10µg).

Foi realizado o teste da clindamicina, pois o *S. aureus* pode apresentar resistência induzida a essa droga. O teste consiste em aproximar o disco de clindamicina (2µg) 15 a 26mm do disco de eritromicina (15µg). Após o período de incubação, o organismo que não apresentou achatamento do halo de inibição da clindamicina foi considerado sensível à clindamicina. Organismos que mostraram achatamento do halo da clindamicina adjacente ao disco de eritromicina indicaram resistência induzível à clindamicina e o resultado foi reportado como resistência à clindamicina.<sup>80-81</sup>

Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi realizada através de swab estéril na superfície de Agar Mueller Hinton, e a seguir aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI.<sup>80</sup> A cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como controle em todos os experimentos.

---

### 3.8 Determinação da produção de $\beta$ -lactamase

A produção de  $\beta$ -lactamases em amostras de *S. aureus* foi detectada através do uso de discos impregnados com Nitrocefina (Cefalosporina cromogenica-cefinase BBL). Os isolados estudados foram semeadas em ágar sangue de forma a se obter colônias isoladas e após incubação a 37°C/24hs, uma pequena massa de crescimento bacteriano, foi coletada e depositada sobre os discos impregnados com Nitrocefina. Como a reação requer umidade, foram adicionadas previamente de uma a duas gotas de água destilada estéril sobre os discos. A reação positiva foi evidenciada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelha e a negativa pela não alteração de cor. Para os isolados  $\beta$ -lactamases negativas, a reação foi reexaminada após uma hora, conforme recomendações do fabricante. Para a correta análise dos resultados, os discos testados foram sempre comparados com as linhagens padrões de *S. aureus* ATCC 29213 (controle positivo) e *S. xylosus* ATCC 25923 (controle negativo). Para a correta análise dos resultados, os discos em testes foram sempre comparados com o disco não usado.

### 3.9 Hiperprodução de $\beta$ -lactamase

As amostras que apresentaram resultado negativo na detecção do gene *mecA* e apresentaram resistência à oxacilina pelos métodos fenotípicos foram testadas para verificar se são hiperprodutoras de  $\beta$ -lactamase. Essas amostras foram testadas com um disco de amoxicilina (20 $\mu$ g) e ácido clavulânico (10 $\mu$ g). O *breakpoint* para sensibilidade foi a formação de um halo de inibição de  $\geq 20$  mm após 24h de incubação à 35° C.<sup>82</sup>

---

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

#### 3.10.1 Extração do ácido nucléico

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

A extração foi realizada com o Kit Illustra Blood genomicPrep mini spin (GE Health Care) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada 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 500 µl de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida a centrifugação a 11.000 x g 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, utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a 4°C.

#### 3.10.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

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 1**), 2,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 0,75µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM) e 3µl do DNA da amostra. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al.<sup>83</sup> que consistem 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 *mec A*

| Função | Nome         | Sequência de nucleotídeos 5'a 3' | Produto amplificado |
|--------|--------------|----------------------------------|---------------------|
| Primer | <i>mecA1</i> | AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG      | 533 bp              |
| Primer | <i>mecA2</i> | AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG      |                     |

Fonte: Murakami et al.<sup>83</sup>

### 3.11 Detecção dos genes *lukS*-PV – *lukF*-PV da leucocidina Panton-Valentine

#### 3.11.1 Extração do ácido nucléico

A extração seguirá o protocolo do item 3.10.1.

#### 3.11.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

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, 0,75µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM) e 3µl do DNA da amostra. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, de acordo com Lina et al.<sup>84</sup> 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 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 49775) e negativo (*S. aureus* ATCC 29213).



**Tabela 2:** Oligonucleotídeos para a detecção dos genes *lukS*-PV, *lukF*-PV

| Função | Nome             | Sequência de nucleotídeos 5' a 3'        | TPA <sup>a</sup> |
|--------|------------------|------------------------------------------|------------------|
| Primer | <i>Luk</i> -PV-1 | ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCCA | 433 pb           |
| Primer | <i>Luk</i> -PV-2 | GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC      |                  |

<sup>a</sup> Tamanho do produto amplificadoFonte: Lina et al.<sup>84</sup>

### 3.12 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 a amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

### 3.13 Determinação do tipo de *SCCmec*

A determinação do tipo de *SCCmec* foi realizado pela técnica de PCR-Multiplex com o primers descritos na **Tabela 3**, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre<sup>85</sup> e modificado por Milheiriço et al.<sup>86</sup>

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos usados na caracterização do SCCmec em *S. aureus*.

| Primer          | Sequência de nucleotídeos 5'a 3'  | SCCmec/R <sup>a</sup>           | TPA <sup>b</sup> |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------|
| dcs F2          | 5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3'    | I, II, IV e VI,<br>região J3    | 342              |
| dcs R1          | 5' – CTAAATCATAGCCATGACCG – 3'    |                                 |                  |
| mecA P4         | 5' – TCCAGATTACAACCTCACCAGG – 3'  |                                 |                  |
| mecA P7         | 5' – CCACTTCATATCTTGTAAACG – 3'   | Controle<br>interno<br>positivo | 162              |
| Cif2 F2         | 5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3' | I, região J1                    | 495              |
| Cif2 R2         | 5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'  |                                 |                  |
| mecI P2         | 5' – ATCAAGACTTGCATTACAGGC – 3'   | II and III,<br>complexo mec     | 209              |
| mecI P3         | 5' – GCGGTTTCAATTCACTTGTC – 3'    |                                 |                  |
| Rif5 F10        | 5' – TTCTTAAGTACACGCTGAATCG – 3'  | III, região J3                  | 414              |
| Rif5 R13        | 5' – GTCACAGTAATTCATCAATGC – 3'   |                                 |                  |
| ccrC F2         | 5' – GTACTCGTTACAATGTTTGG – 3'    | V, complexo<br>ccr              | 449              |
| ccrC R2         | 5' – ATAATGGCTTCATGCTTACC – 3'    |                                 |                  |
| kdp F1          | 5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3'  | II, região J1                   | 284              |
| kdp R1          | 5' – CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG – 3'  |                                 |                  |
| SCCmec V J1 F   | 5' – TTCTCCATTCTTGTTTCATCC – 3'   | V, região J1                    | 377              |
| SCCmec V J1 R   | 5' – AGAGACTACTGACTTAAGTGG – 3'   |                                 |                  |
| ccrB2 F2        | 5' – AGTTTCTCAGAATTCGAACG – 3'    | II and IV,<br>complexo ccr      | 311              |
| ccrB2 R2        | 5' – CCGATATAGAAWGGGTTAGC – 3'    |                                 |                  |
| SCCmec III J1 F | 5' – CATTTGTGAAACACAGTACG – 3'    | III, região J1                  | 243              |
| SCCmec III J1 R | 5' – GTTATTGAGACTCCTAAAGC – 3'    |                                 |                  |

Fonte: Milheirico et al.<sup>86</sup> e Oliveira e Lencastre<sup>85</sup>

<sup>a</sup> Tipo de SCCmec/Região amplificada.

<sup>b</sup> Tamanho do produto amplificado.

Foram utilizados 8 loci (A-H), selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente.<sup>87-88</sup> Como controle para a tipagem do SCCmec foram utilizadas as cepas COL para SCCmec tipo I; N315 para SCCmec tipo II; PER34 para o SCCmec tipo II; AN546 para o SCCmec tipo III; HU25 para o SCCmec tipo IIIA; MW2 para o SCCmec tipo IV e JCSC4469 para o SCCmec tipo IV e JCSC 3624 para SCCmec tipo V.

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.<sup>89</sup> 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 SCC<sub>mec</sub> em ECN.

| Primer         | Sequência de nucleotídeos 5'a 3'  | SCC <sub>mec</sub> /R <sup>a</sup> | TPA <sup>b</sup> |
|----------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|
| <b>CIF2 F2</b> | 5' – TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG – 3' | I, região J1                       | 495              |
| <b>CIF2 R2</b> | 5' – ATTTACCACAAGGACTACCAGC – 3'  |                                    |                  |
| <b>KDP F1</b>  | 5' – AATCATCTGCCATTGGTGATGC – 3'  | II, região J1                      | 284              |
| <b>KDP R1</b>  | 5' – CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG – 3'  |                                    |                  |
| <b>DCS F2</b>  | 5' – CATCCTATGATAGCTTGGTC – 3'    | I, II, IV<br>região J3             | 342              |
| <b>DCS R1</b>  | 5' – CTAAATCATAGCCATGACCG – 3'    |                                    |                  |
| <b>RIF4 F3</b> | 5' – GTGATTGTTCGAGATATGTGG – 3'   | III região J3                      | 414              |
| <b>RIF4 R9</b> | 5' – CGCTTTATCTGTATCTATCGC – 3'   |                                    |                  |

Fonte: Milheirinho et al.<sup>86</sup>, Oliveira e Lencastre et al.<sup>85</sup> e Machado et al.<sup>89</sup>

<sup>a</sup>Tipo de SCC<sub>mec</sub>/ Região amplificada.

<sup>b</sup>Tamanho do produto amplificado.

### 3.14 Análise Estatística

Para a análise dos dados obtidos nos questionários, foram utilizados os softwares EPI-INFO for windows, versão 3.2 (© Centers for Disease Control and Prevention, USA) e SPSS versão 15.0 (© SPSS, inc.). Para comparação entre as variáveis categóricas foram realizados testes não-paramétricos para proporção:  $X^2$  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. Foi utilizado nível de significância final de 0,05.

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.

### 3.15 Análise de Fatores de Risco do Hospedeiro para aquisição de *S. aureus*

As análises levaram em conta dois desfechos: (a) o isolamento de *S. aureus* em geral; e (b) o isolamento de MRSA, definido pela positividade do PCR para *mecA*. Foram avaliados dados demográficos, renda mensal, características de moradia, comorbidades e uso prévio de antimicrobianos. Todas as análises foram feitas para os dois desfechos de interesse. Em uma primeira fase, os dados foram submetidos a análise univariada. Variáveis dicotômicas foram analisadas pelos testes do Chi-quadrado e Exato de Fisher. Variáveis numéricas foram analisadas pelo Teste U de Mann-Whitney. A seguir, todas as variáveis foram introduzidas em modelos multivariados de regressão logística. Para introdução de variáveis, foi utilizado um processo de seleção por avanços (*forward*). Para inclusão e exclusão de variáveis, foram utilizados parâmetros de significância (p-valor) de 0,05 e 0,10, respectivamente. Um p-valor de 0,05 foi empregado como valor final de significância.<sup>90</sup>

---

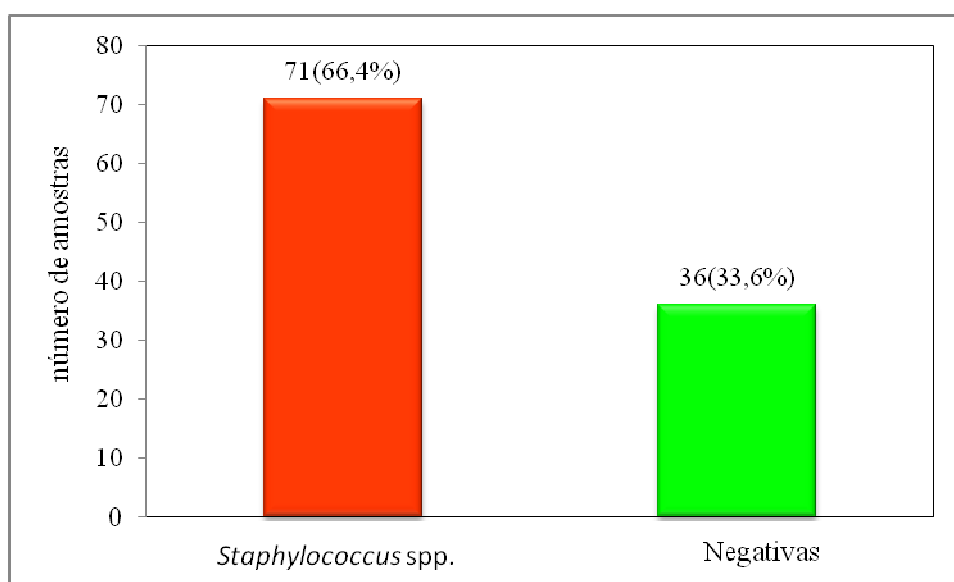
*Resultados*

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amostragem

Participaram do estudo 107 pacientes atendidos nas unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu, no período de março de 2010 à fevereiro de 2011. Foram coletados 126 *swabs* desses pacientes, em decorrência do número de lesões apresentadas por cada participante, destas 73 amostras foram do gênero *Staphylococcus* spp. A cultura bacteriológica demonstrou resultado positivo para o gênero *Staphylococcus* spp. em 71/107 (66,4%) pacientes e resultado negativo para 36/107 (33,6%) pacientes (**Figura 2**).

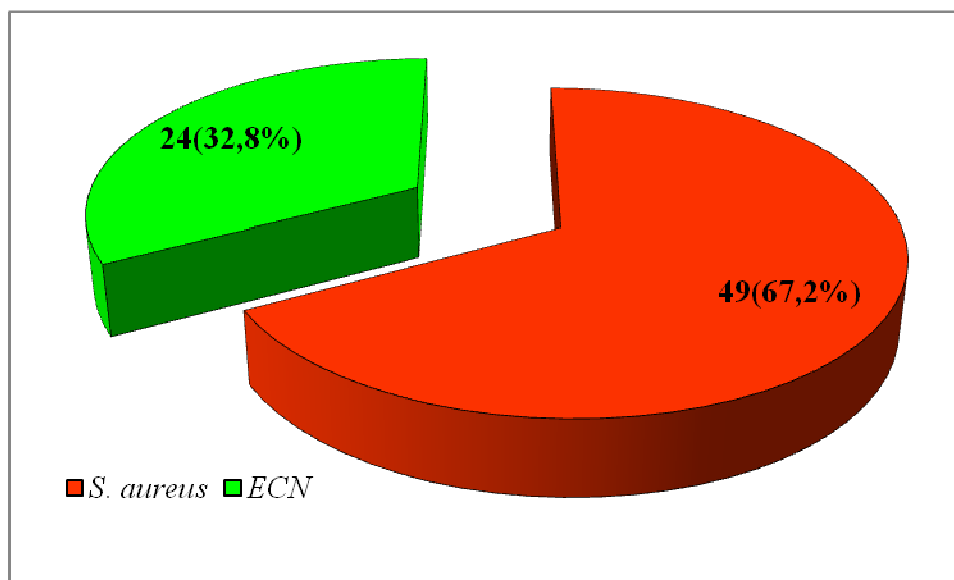


**Figura 2:** Número de pacientes com culturas positivas para o gênero *Staphylococcus* spp.

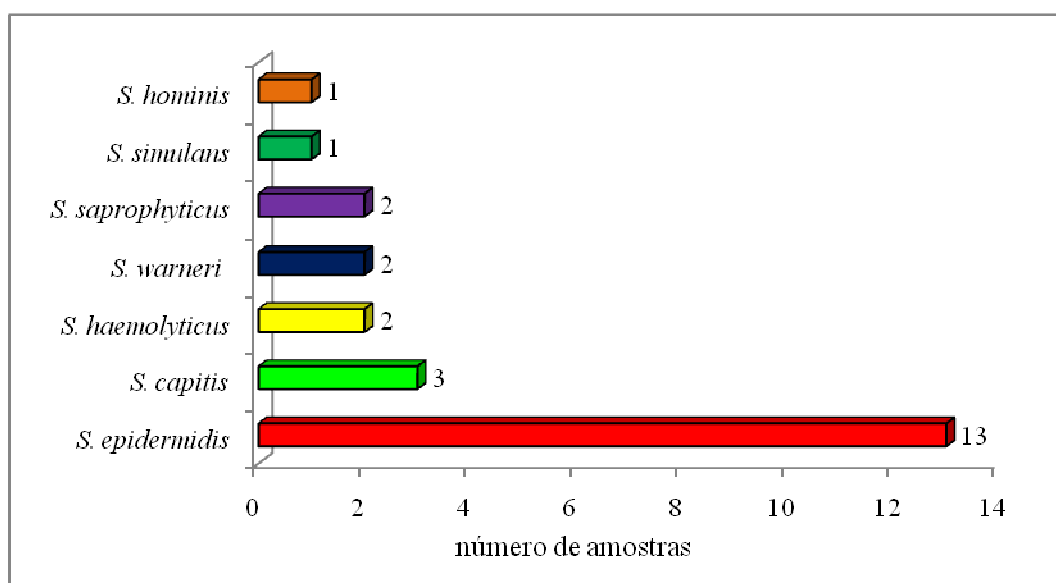
### 4.2 Identificação das espécies de *Staphylococcus* spp.

Dentro do gênero *Staphylococcus* foi identificado 49/73(67,1%) amostras da espécie *Staphylococcus aureus* e 24/73 (32,9%) amostras de ECN (**Figura 3**). As espécies de ECN identificadas foram: 13/24(54,2%) amostras de *S. epidermidis*, 3/24(12,5%) amostras de *S. capitis*, 2/24(8,3%) amostras de *S. haemolyticus*,

2/24(8,3%) amostras de *S. warneri*, 2/24(8,3%) de *S. saprophyticus*, 1/24(4,2%) amostra de *S. hominis* e 1/24(4,2%) amostra de *S. simulans* (**Figura 4**).



**Figura 3:** Distribuição de *S. aureus* e ECN isolados de feridas de pacientes atendidos nas UBSs do município de Botucatu.



**Figura 4:** Distribuição das espécies de ECN isoladas de feridas de pacientes atendidos nas UBSs do município de Botucatu.

### 4.3 Perfil dos Participantes

Os 107 participantes deste estudo apresentaram mediana de idade de 68 anos e média de 67,5 anos, variando de 38 a 95 anos, caracterizando uma população idosa, sendo que 68/107(63,6%) dos pacientes foram do sexo feminino e 39/107(36,4%) do sexo masculino.

Quanto a escolaridade, 60/107(56%) participantes referiram não ter completado o ensino fundamental, 29/107(27,1%) referiram-se como analfabetos, 12/107(11,2%) relataram ensino fundamental completo, apenas 4/107(3,7%) com ensino médio completo e 2/107(1,8%) com ensino superior incompleto.

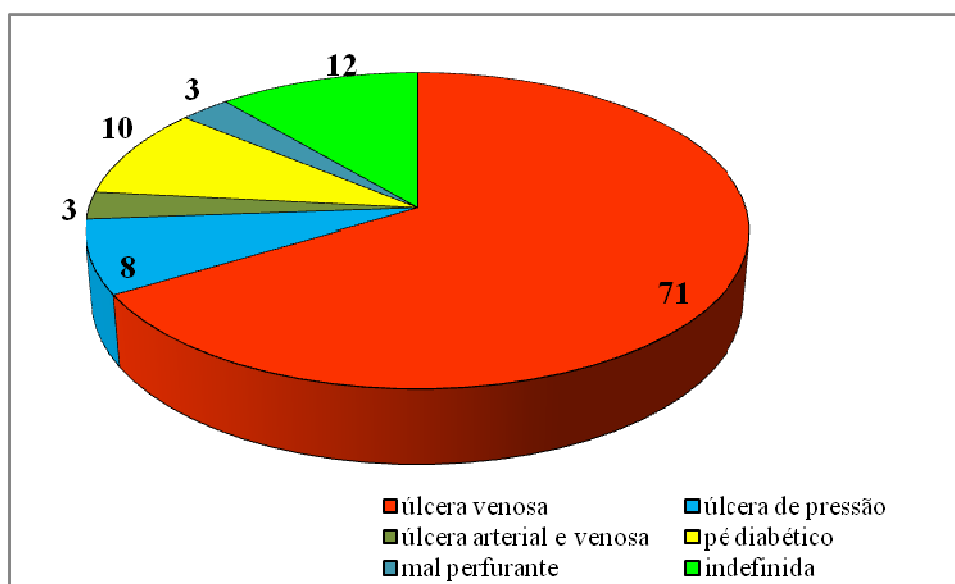
Quando perguntado sobre a ocupação de cada participante, 74/107(69,1%) referiram-se aposentados, 17/107(15,8%) donas de casa, 3/107(2,8%) pensionistas, comerciantes e pedreiros, e 1/107(0,9%) balconista, caseiro, criador de gado, treinador de cavalos, garçone e vigilante.

A comorbidade mais freqüente foi a hipertensão arterial acometendo 73/107(68,2%) participantes, seguida pelo diabetes *mellitus* com 36/107(33,6%) e a dislipidemia com 26/107(24,2%) casos.

De acordo com o diagnóstico médico, 71/107(66,3%) pacientes apresentavam úlcera venosa, 10/107(9,3%) pé diabético, 8/107(7,5%) ulcera de pressão, 3/107(2,8%) ulcera mista (arterial e venosa), 3/107(2,8%) mal perfurante e 12/107(11,2%) não foram definidas (**Figura 5, 6 e 7**). De acordo com a classificação utilizada, 97/107(90,6%) pacientes apresentavam feridas classificadas como crônicas e 10/107(9,4%) pacientes como agudas. Durante a realização do estudo, em nenhuma ferida foi verificado sinais ou sintomas de infecção, portanto classificadas como colonizadas. A mediana do tempo de duração da ferida foi de 20 anos, variando de 1 a 600 meses.

---





**Figura 5:** Distribuição dos diagnósticos de feridas apresentados pelos pacientes atendidos pelas UBSs de Botucatu.



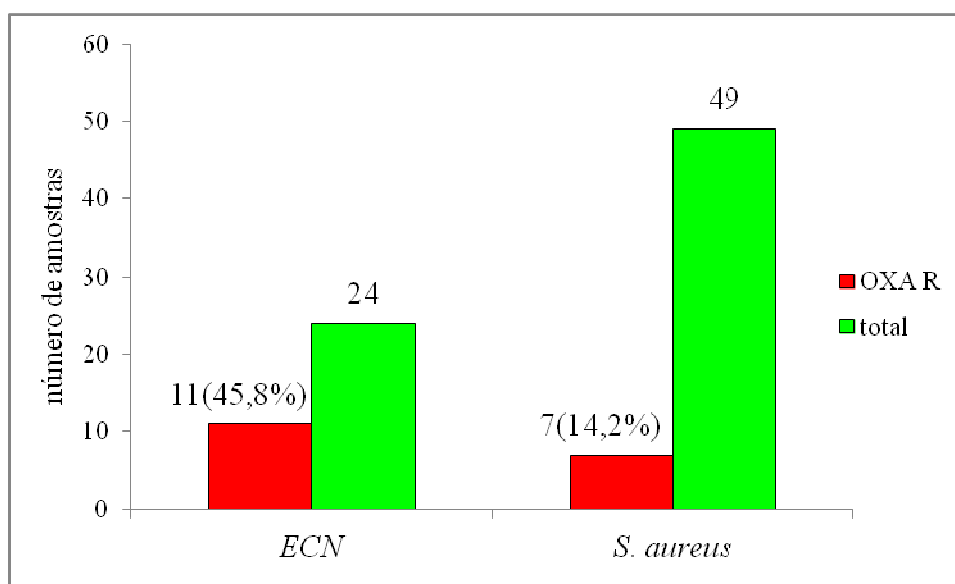
**Figura 6:** Úlcera venosa de perna de paciente atendido pela USF Marajoara, da qual foi isolado MRSA SCCmec tipo IV.



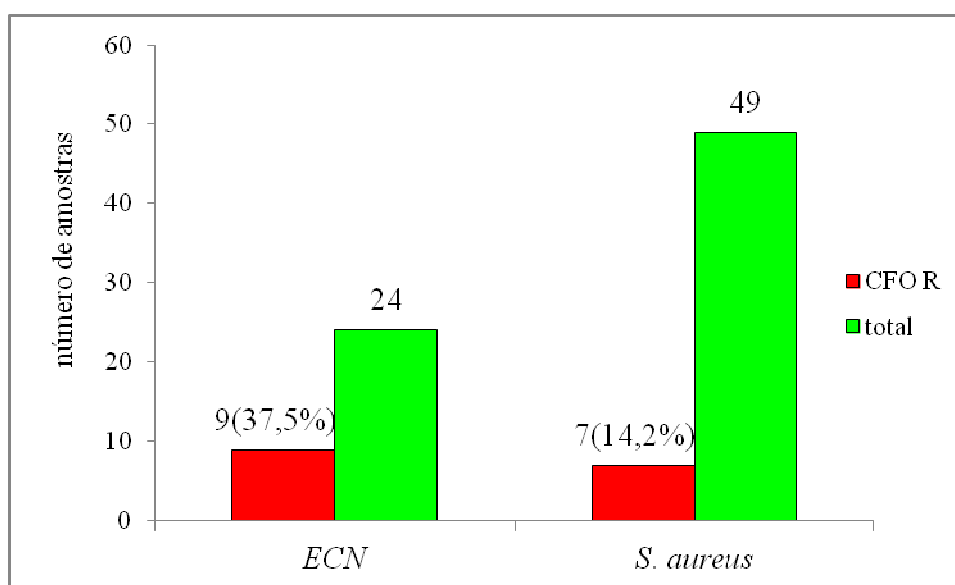
**Figura 7:** Úlcera venosa de perna de paciente atendido pela UBS Cohab I, da qual foi isolado MRSA com SCCmec tipo II.

#### **4.4 Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas “*in vitro*”- Técnica da difusão da droga em ágar (Método Kirby- Bauer).**

A avaliação da resistência à meticilina pelo método de disco-difusão revelou 18/73(24,6%) amostras resistentes ao disco de oxacilina e 16/73(21,9%) resistentes a cefoxitina. Das 49 amostras de *S. aureus*, 7(14,2%) foram resistentes à oxacilina e cefoxitina; 11/24(45,8%) amostras de ECN mostraram-se resistentes a oxacilina e 9/24 (37,5%) resistentes à cefoxitina (**Figura 8 e 9**).



**Figura 8:** Distribuição de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a oxacilina pelo método de disco difusão em ágar com disco de oxacilina. OXA R= oxacilina resistente.



**Figura 9:** Distribuição de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) resistentes a cefoxitina pelo método de difusão em ágar com disco de cefoxitina. CFO R= cefoxitina resistente.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão revelou maior resistência a Penicilina (83,5%) seguido por Eritromicina (45,2%), Gentamicina (24,6%) e Clindamicina (23,2%), sendo que uma amostra foi detectada resistência pelo teste D. Segue com Levofloxacino (20,5%), Trimetoprim-

sulfametoxazol (9,5%), ácido fusídico (2,7%), e nenhuma amostra resistente para Quinupristina/Dalfopristina, Linezolida, Tigeciclina e Vancomicina (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Resistência a drogas em amostras de *S. aureus* e Estafilococos coagulase-negativa.

| Antimicrobiano             | Total (73) |      | <i>S. aureus</i> (49) |      | Resistência MRSA <sup>a</sup> (7) |      | ECN <sup>b</sup> (24) |      | MRSCN <sup>c</sup> |      |
|----------------------------|------------|------|-----------------------|------|-----------------------------------|------|-----------------------|------|--------------------|------|
|                            | N          | %    | N                     | %    | N                                 | %    | N                     | %    | N                  | %    |
| Penicilina                 | 61         | 83,5 | 39                    | 79,5 | 7                                 | 100  | 22                    | 91,6 | 13                 | 100  |
| Eritromicina               | 33         | 45,2 | 17                    | 34,6 | 6                                 | 85,7 | 16                    | 66,6 | 11                 | 84,6 |
| Gentamicina                | 18         | 24,6 | 10                    | 20,4 | 1                                 | 14,2 | 8                     | 33,3 | 8                  | 61,5 |
| Clindamicina               | 16         | 21,9 | 5                     | 10,2 | 4                                 | 57,1 | 11                    | 45,8 | 9                  | 69,2 |
| Teste D                    | 1          | 1,3  | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 1                     | 4,1  | 1                  | 7,6  |
| Levofloxacino              | 15         | 20,5 | 4                     | 8,1  | 4                                 | 57,1 | 11                    | 45,8 | 9                  | 69,2 |
| TMP-Sulfa                  | 7          | 9,5  | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 7                     | 29,1 | 6                  | 46,1 |
| Ácido Fusídico             | 2          | 2,7  | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 2                     | 8,3  | 1                  | 7,6  |
| Quinup./Dalf. <sup>d</sup> | 0          | 0    | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 0                     | 0    | 0                  | 0    |
| Linezolida                 | 0          | 0    | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 0                     | 0    | 0                  | 0    |
| Tigeciclina                | 0          | 0    | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 0                     | 0    | 0                  | 0    |
| Vancomicina                | 0          | 0    | 0                     | 0    | 0                                 | 0    | 0                     | 0    | 0                  | 0    |

<sup>a</sup>MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

<sup>b</sup>ECN: Estafilococos coagulase-negativa.

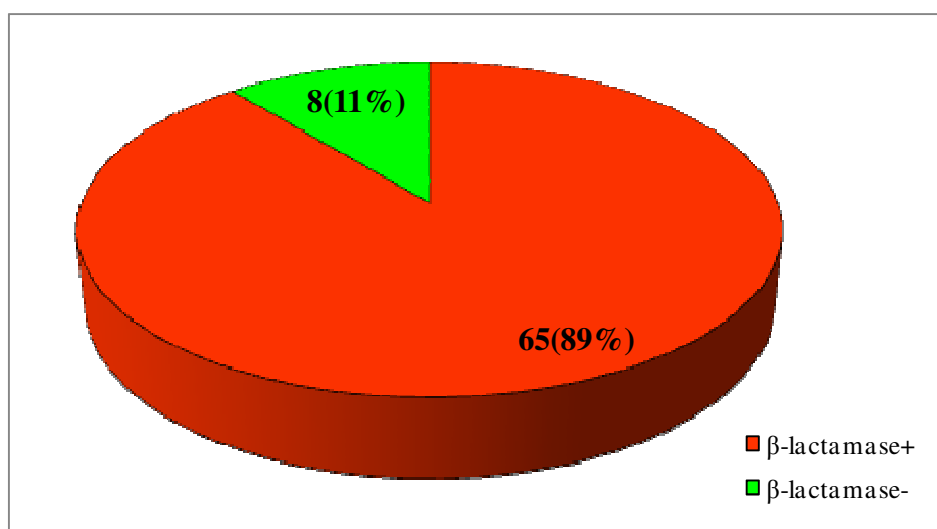
<sup>c</sup>MRSCN: Estafilococos coagulase-negativa resistentes à meticilina.

<sup>d</sup>Quinup./Dalf.: Quinupristina/Dalfopristina.

Os resultados demonstram uma maior resistência antimicrobiana nos isolados de ECN, principalmente, relacionado às seguintes drogas: Eritromicina, Levofloxacino, Clindamicina, Trimetoprim-sulfametazol e Ácido fusídico. Os dois isolados de ECN resistentes ao ácido fusídico foram da espécie *S. haemolyticus*.

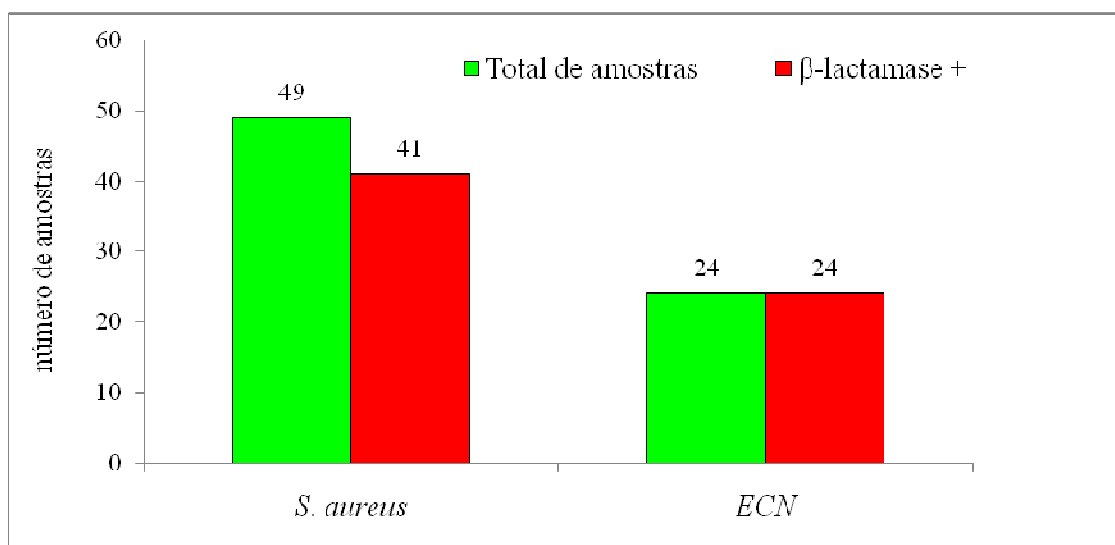
#### 4.5 Determinação da produção de $\beta$ -lactamase

Do total de 73 amostras de *Staphylococcus* spp. incluídas neste estudo, 65/73(89%) se apresentaram produtoras de  $\beta$ -lactamase (**Figura 10**). Uma amostra foi negativa para o gene *mecA* e resistente ao disco de oxacilina e cefoxitina, contudo foi produtora de  $\beta$ -lactamase.



**Figura 10:** Produção de  $\beta$ -lactamase em amostras de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras coletadas de feridas.

Do total de *S. aureus* e ECN, 41/49(83,6%) e 24(100%) dos isolados foram produtores de  $\beta$ -lactamase, respectivamente (**Figura 11**).



**Figura 11:** Produção de  $\beta$ -lactamase em amostras de *S. aureus* e ECN provenientes de amostras coletadas de feridas.

#### 4.6 Hiperprodução de $\beta$ -lactamase

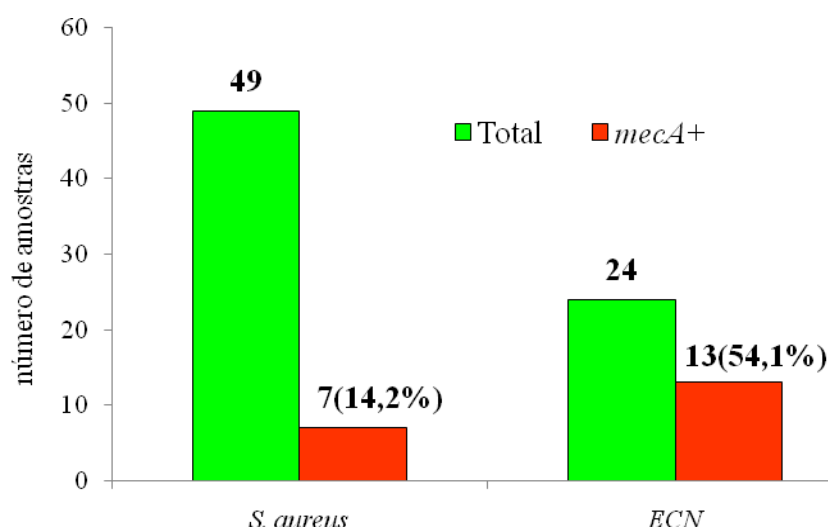
Das 73 amostras de *Staphylococcus* spp., 1/73(1,3%) amostra de *S. simulans* foi negativa para o gene *mecA* e apresentou resistência à oxacilina e cefoxitina pelo método de disco difusão. Contudo, essa amostra foi positiva para produção de  $\beta$ -lactamase e

sensível ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico, indicando uma possível resistência à oxacilina mediada pela hiperprodução de  $\beta$ -lactamase

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

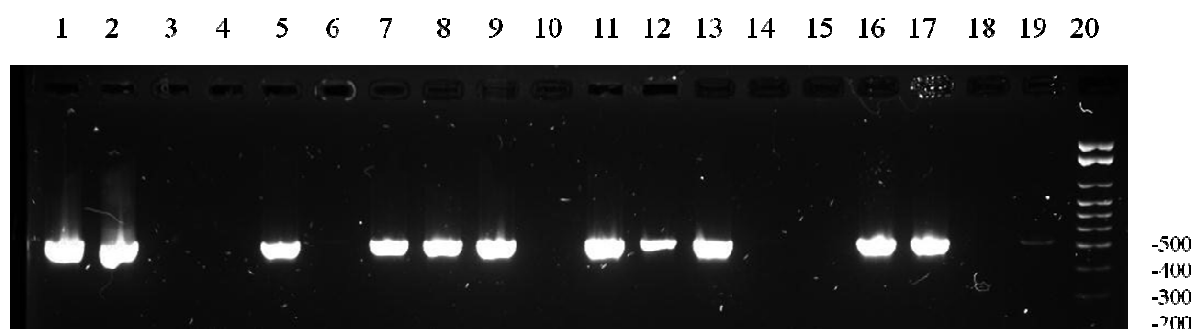
De 73 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de feridas de pacientes atendidos pelas UBSs do município de Botucatu, a presença do gene *mecA* foi identificada em 20/73(27,4%) amostras. Destas, 13/20(65%) amostras foram espécies de ECN e 7/20(35%) amostras da espécie *S. aureus*.

Assim, de um total de 49 isolados de *S. aureus*, 7/49(14,2%) isolados positivos para o gene *mecA* e de 24 isolados de ECN, 13/24(54,1%) isolados *mecA* positivos (Figura 12 e 13).



**Figura 12:** Amostras de *Staphylococcus* spp. positivas para presença do gene *mecA* de resistência.

A prevalência de MRSA e MRCoNS dentre os pacientes incluídos no estudo foi de 7/107(6,5%) e 13/107(12,2%), respectivamente.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *mecA*(533pb) pela técnica de PCR. Linhas 1-2; 5; 7-9; 11-13;16-17: amostras positivas para o gene *mecA*. Linhas 3;4;6;10;14-15: amostras negativas para o gene *mecA*. Linha 18: controle negativo (ATCC 25923). Linha 19: controle positivo (ATCC 33591). Linha 20: Ladder 100pb.

O gene de resistência foi detectado em 7/49(14,2%) das amostras isoladas de *S. aureus*, sendo todas estas resistentes a oxacilina e cefoxitina. Não houve amostras de *S. aureus* negativa para presença do gene *mecA* e resistentes a essas drogas (**Tabela 6**).

**Tabela 6:** Determinação da sensibilidade a oxacilina e cefoxitina em amostras de *S. aureus* por métodos genotípicos e fenotípicos.

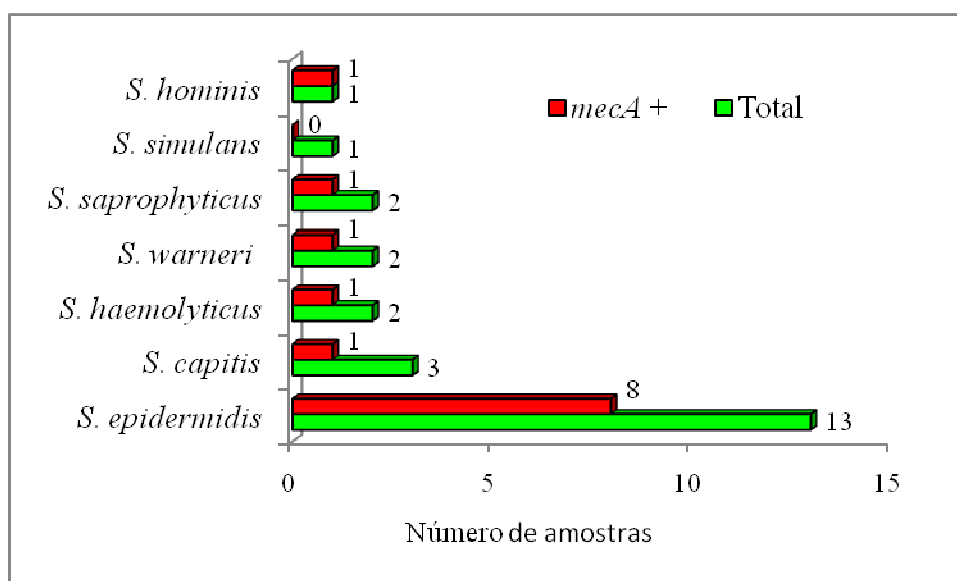
| PCR <sup>a</sup>                   | Teste de disco difusão para <i>S. aureus</i> |     |          |     |            |     |          |     |
|------------------------------------|----------------------------------------------|-----|----------|-----|------------|-----|----------|-----|
|                                    | Oxacilina                                    |     |          |     | Cefoxitina |     |          |     |
|                                    | Resistente                                   |     | Sensível |     | Resistente |     | Sensível |     |
|                                    | N                                            | %   | N        | %   | N          | %   | N        | %   |
| <i>mecA</i> + <sup>b</sup><br>n=7  | 7                                            | 100 | 0        | 0   | 7          | 100 | 0        | 0   |
| <i>mecA</i> - <sup>c</sup><br>n=42 | 0                                            | 0   | 42       | 100 | 0          | 0   | 42       | 100 |
| Total<br>n=49                      | 7                                            | 100 | 42       | 100 | 7          | 100 | 42       | 100 |

<sup>a</sup>PCR: Reação em cadeia da polimerase.

<sup>b</sup>*mecA*+: Amostras positivas para o gene *mecA*.

<sup>c</sup>*mecA*-: Amostras negativas para o gene *mecA*.

Quanto aos ECN, das 13 amostras *mecA* positivas, 8/13(61,5%) foram *S. epidermidis*, 1/13(7,6%) *S. capitis*, 1/13(7,6%) *S. warneri*, 1/13(7,6%) *S. haemolyticus*, 1/13 (7,6%) *S. saprophyticus* e 1/13 (7,6%) *S. hominis* (**Figura 14**).



**Figura 14:** Distribuição do gene *mecA* nas espécies de Estafilococos coagulase-negativa isoladas de feridas de pacientes atendidos nas UBSs de Botucatu.

Os resultados demonstraram que dentre os isolados de ECN resistentes (*mecA*+), 10/13(76,9%) isolados apresentaram resistência a oxacilina e 8/13(61,5%) à cefoxitina. 1/13(7,6%) isolado de *S. haemolyticus* não apresentou resistência aos discos de oxacilina e cefoxitina, sendo *mecA* positivo, caracterizando uma possível heteroresistência. Um isolado de *S. simulans* apresentou resistência fenotípica aos discos, mas não teve detectado a presença do gene de resistência, sendo posteriormente, comprovado a hiperprodução de  $\beta$ -lactamase (**Tabela 7**).



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

| Teste de disco difusão para <i>S. aureus</i> |                              |            |             |           |             |            |             |           |             |
|----------------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| PCR <sup>b</sup>                             | Oxacilina                    |            |             |           |             | Cefoxitina |             |           |             |
|                                              | Espécie                      | Resistente |             | Sensível  |             | Resistente |             | Sensível  |             |
|                                              |                              | N          | %           | N         | %           | N          | %           | N         | %           |
| <i>mecA</i> <sup>+</sup><br>n=13             | <i>S. epidermidis</i> (8)    | 7          | 87,5        | 1         | 12,5        | 6          | 100         | 2         | 0           |
|                                              | <i>S. capitis</i> (1)        | 1          | 100         | 0         | 0           | 1          | 100         | 0         | 0           |
|                                              | <i>S. warneri</i> (1)        | 1          | 100         | 0         | 0           | 0          | 0           | 1         | 100         |
|                                              | <i>S. haemolyticus</i> (1)   | 0          | 0           | 1         | 100         | 0          | 0           | 1         | 100         |
|                                              | <i>S. saprophyticus</i> (1)  | 1          | 100         | 0         | 0           | 0          | 0           | 1         | 100         |
|                                              | <i>S. hominis</i> (1)        | 0          | 0           | 1         | 100         | 1          | 100         | 0         | 0           |
|                                              | <b>ECN<sup>a</sup> Total</b> | <b>10</b>  | <b>76,9</b> | <b>3</b>  | <b>23</b>   | <b>8</b>   | <b>61,5</b> | <b>5</b>  | <b>38,5</b> |
| <i>mecA</i> <sup>-</sup><br>n=11             | <i>S. epidermidis</i> (5)    | 0          | 0           | 5         | 100         | 0          | 0           | 5         | 100         |
|                                              | <i>S. capitis</i> (2)        | 0          | 0           | 2         | 100         | 0          | 0           | 2         | 100         |
|                                              | <i>S. warneri</i> (1)        | 0          | 0           | 1         | 100         | 0          | 0           | 1         | 100         |
|                                              | <i>S. haemolyticus</i> (1)   | 0          | 0           | 1         | 100         | 0          | 0           | 1         | 100         |
|                                              | <i>S. saprophyticus</i> (1)  | 0          | 0           | 1         | 100         | 0          | 0           | 1         | 100         |
|                                              | <i>S. simulans</i> (1)       | 1          | 100         | 0         | 0           | 1          | 100         | 0         | 0           |
|                                              | <b>ECN<sup>a</sup> Total</b> | <b>1</b>   | <b>9,1</b>  | <b>10</b> | <b>90,9</b> | <b>1</b>   | <b>9,1</b>  | <b>10</b> | <b>90,9</b> |

<sup>a</sup>ECN: *Estafilococos* coagulase-negativa.<sup>b</sup>PCR: Reação em cadeia da polimerase.<sup>c</sup>*mecA*<sup>+</sup>: Amostras positivas para o gene *mecA*.<sup>d</sup>*mecA*<sup>-</sup>: Amostras negativas para o gene *mecA*.

#### 4.8 Detecção dos genes *lukS*-PV – *lukF*-PV da leucocidina Pantón-Valentine.

De 49 isolados de *S. aureus* utilizados para a pesquisa dos genes produtores da leucocidina Pantón-Valentine pela técnica de PCR, em nenhum isolado foi detectado a presença dos genes da PVL.

#### 4.9 Determinação do tipo de SCC*mec*

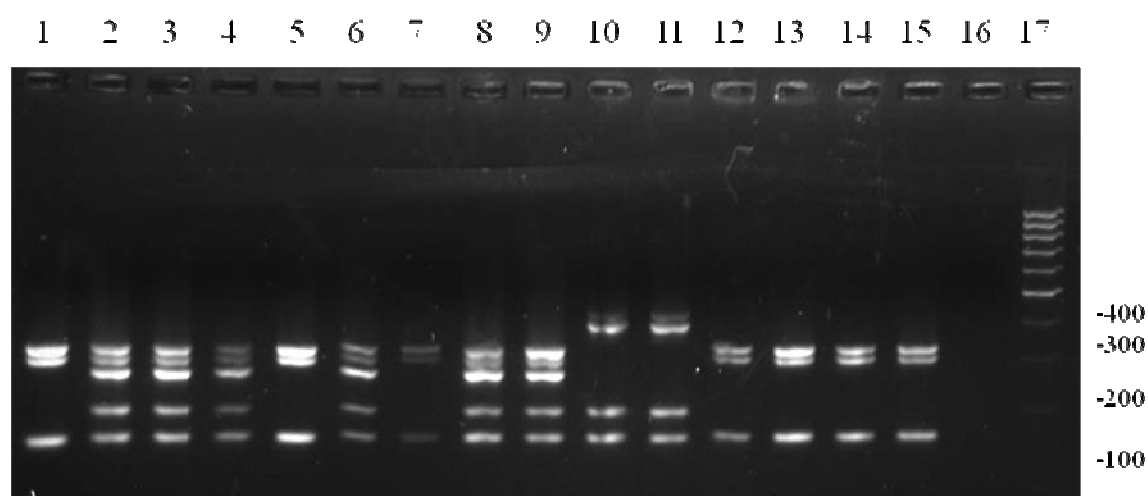
Das 7/49(14,2%) amostras de *S. aureus* que apresentaram o gene *mecA*, 4/7 (57,2%) apresentaram o SCC*mec* do tipo II e 3/7 (42,8%) do tipo IV (Tabela 8 e Figura 15).

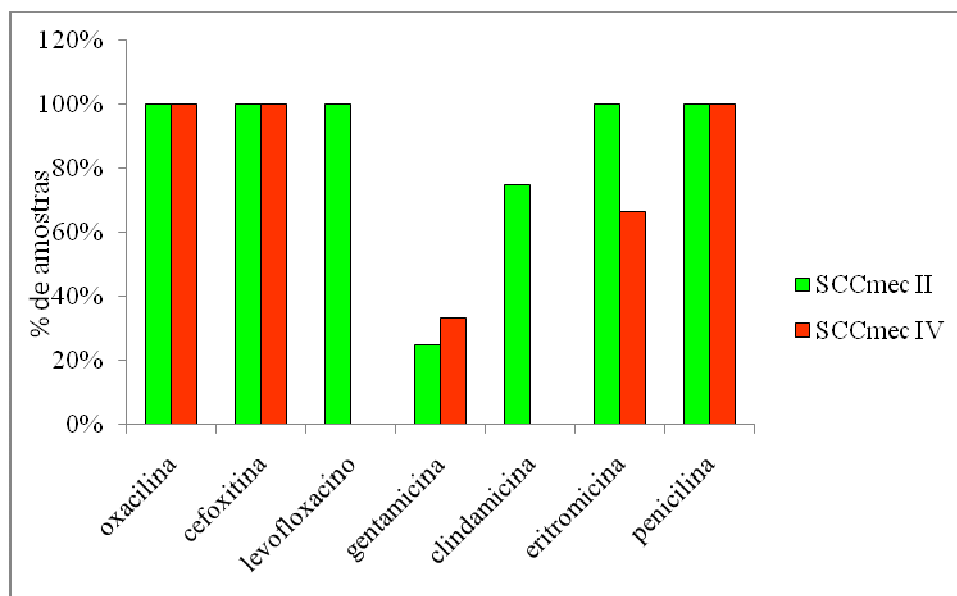
**Tabela 8.** Frequência de cassetes cromossômicos encontrados em *S. aureus* relacionado com a UBS de origem.

| MRSA | SCCmec | Drogas resistentes                 | UBS <sup>a</sup> |
|------|--------|------------------------------------|------------------|
| 1    | II     | oxa, cfo, lvx, cli, eri e pen      | CSE-UVF          |
| 2    | II     | oxa, cfo, lvx, cli, eri e pen      | CSE-Lav          |
| 3    | II     | oxa, cfo, lvx, cli, eri e pen      | Cohab            |
| 4    | II     | oxa, cfo, lvx, gen, cli, eri e pen | Aeroporto        |
| 5    | IV     | oxa, cfo, gen, eri e pen           | Cohab            |
| 6    | IV     | oxa, cfo, eri e pen                | Marajoara        |
| 7    | IV     | oxa, cfo e pen                     | Iolanda          |

oxa: oxacilina; cfo: cefoxitina; lvx: levofloxacino; cli: clindamicina; eri: eritromicina; pen: penicilina; gen: gentamicina.

<sup>a</sup>UBS: Unidade básica de saúde.

**Figura 15:** Linhas 1, 5 e 7: amostras SCCmec tipo IV; Linhas: 2, 3, 4 e 6: amostras SCCmec tipo II; Linha 8: controle tipo II (PER34); Linhas 10 e 11 controles tipo III e IIIa (AN546, HU25); Linhas 12-15: controles IVa, IVb, IVc, IVd (JCSC 1968, JCSC978, MR 108, JCSC 4469); Linha 16: água; Linha 17: marcador de 100pb.



**Figura 16:** Resistência a antimicrobianos de acordo com os tipos de SCCmec em MRSA.

O perfil de resistência dos isolados de MRSA demonstraram semelhante resistência à oxacilina, cefoxitina e penicilina (100%) para isolados SCCmec tipo II e IV. Apenas os isolados de MRSA tipo II, apresentaram resistência aos discos de levofloxacino (100%) e clindamicina (75%) e também considerável resistência a eritromicina (100%). Entretanto, os isolados SCCmec tipo IV apresentaram importante resistência a gentamicina (33,3%) e eritromicina (66,6%) (**Figura 16**).

Os isolados de MRSA SCCmec tipo II (número: 1, 2 e 3 – **Tabela 8**), coletados nas UBSs: CSE-UVF, CSE-Lavradores e Cohab, apresentaram perfil idêntico de resistência antimicrobiana.

Dentre as 13 amostras de ECN positivas para o gene *mecA*, 7/13(53,8%) amostras foram SCCmec tipo III, 3/13(23%) tipo IV e 3/13(23%) não foram tipadas pelo protocolo utilizado. 3/13(23%) isolados de MRCoNS, espécie *S. epidermidis* e SCCmec tipo III (número: 5, 6 e 7), apresentaram perfil idêntico de resistência as drogas antimicrobianas, sendo duas amostras coletadas na mesma UBS (**Tabela 9**).

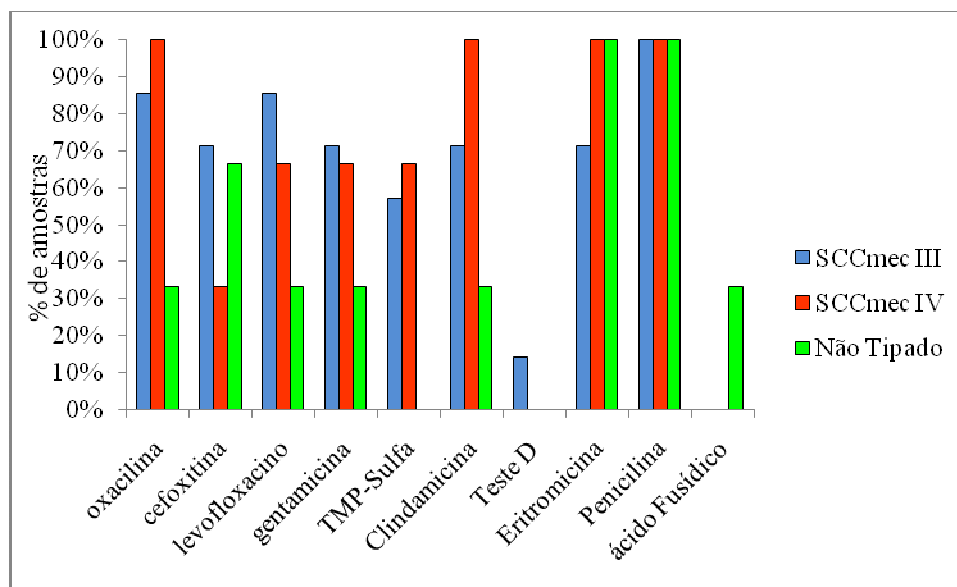
**Tabela 9:** Frequência de cassetes cromossômicos encontrados em ECN relacionado com a UBS de origem.

| MRCoNS | SCCmec | Espécie                 | Drogas resistentes                       | UBS <sup>a</sup> |
|--------|--------|-------------------------|------------------------------------------|------------------|
| 1      | III    | <i>S. epidermidis</i>   | cli, eri e pen                           | Marajoara        |
| 2      | III    | <i>S. capitis</i>       | oxa, cfo, lvx, gen e pen                 | CSI              |
| 3      | III    | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, lvx, cli, eri e pen                 | CSE-UVF          |
| 4      | III    | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, cfo, lvx, gen, sxt e pen            | Marajoara        |
| 5      | III    | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, cfo, lvx, gen, sxt, cli, eri e pen  | CSE-lav          |
| 6      | III    | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, cfo, lvx, gen, sxt, cli, eri, e pen | Marajoara        |
| 7      | III    | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, cfo, lvx, gen, sxt, cli, eri e pen  | Marajoara        |
| 8      | --     | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, cfo, lvx, gen, cli, eri e pen       | Cohab            |
| 9      | IV     | <i>S. epidermidis</i>   | oxa, cfo, lvx, gen, sxt, cli, eri e pen  | CSE-UVF          |
| 10     | IV     | <i>S. saprophyticus</i> | oxa, cli, eri, e pen                     | V. Jardim        |
| 11     | IV     | <i>S. warneri</i>       | oxa, lvx, gen, sxt, cli, eri, e pen      | CSI              |
| 12     | --     | <i>S. haemolyticus</i>  | fd, eri e pen                            | Cohab            |
| 13     | --     | <i>S. hominis</i>       | cfo, eri e pen                           | Rubião Jr.       |

--: não tipado pelo protocolo utilizado.

oxa: oxacilina; cfo: cefoxitina; lvx: levofloxacino; cli: clindamicina; eri: eritromicina; pen: penicilina; gen: gentamicina; fd: ácido fusídico; sxt: sulfametazol/trimetoprim.

<sup>a</sup>UBS: Unidade básica de saúde.

**Figura 17:** Resistência a antimicrobianos de acordo com os tipos de SCCmec em MRCoNS.

Os MRCoNS tipo IV apresentaram resistência ao Trimetoprim-sulfametazol (66,6%), clindamicina (100%) e eritromicina (100%), entretanto, apresentou baixa

resistência ao disco de cefoxitina (33,3%). Os isolados SCCmec tipo III apresentaram resistência, além dos discos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, também aos discos de levofloxacina (85,7%), gentamicina (71,4%), eritromicina (71,4%), clindamicina (71,4%), trimetoprim-sulfametazol (57,1%) e teste D (14,2%) . Os isolados não tipados pela técnica apresentaram 100% de resistência a penicilina e eritromicina, 33,3% de resistência ao ácido fusídico e uma baixa resistência as outras drogas comparado aos tipos SCCmec IV e III. **(Figura 17).**

Quando relacionamos a frequência de isolados de *S. aureus* e ECN com a UBS de origem, verifica-se um maior número de coleta de amostras nas unidades de saúde: CSE-Ferroviária, CSE-Lavradores, CSI, Peabirú e Marajoara, devido a maior demanda em cuidados com feridas. As maiores frequências de MRSA foram isolados de pacientes atendidos nas unidades de saúde Cohab I e Jardim Iolanda com 2/10(20%) e 1/5(20%) isolados, respectivamente, seguidas pela unidade do Aeroporto com 1/8(12,5%) isolado, Marajoara com 1/12(8,3) isolado, CSE-Lavradores com 1/14(7,1%) isolado e CSE-Ferroviária com 1/21(4,7%) isolado **(Tabela 10)**. Nenhuma coleta foi realizada na USF-Real Park, pois encontrava-se em processo de implantação.

---

**Tabela 10:** Isolados de ECN e *S. aureus* relacionados com a UBS de origem.

| UBS             | Total amostras coletadas | ECN<br>N (%) | <i>S. aureus</i><br>N (%) | MRSA <sup>a</sup><br>N (%) | Negativo <sup>b</sup><br>N (%) |
|-----------------|--------------------------|--------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| CSE-Lavradores  | 14                       | 2(14,2)      | 4(28,5)                   | 1(7,1)                     | 8(57,1)                        |
| CSE-Ferroviária | 21                       | 5(23,8)      | 5(23,8)                   | 1(4,7)                     | 11(52,3)                       |
| São Lúcio       | 5                        | 0            | 3(60)                     | 0                          | 2(40)                          |
| Vila Jardim     | 4                        | 1(25)        | 1(25)                     | 0                          | 2(50)                          |
| Cecap           | 6                        | 1(16,6)      | 4(66,6)                   | 0                          | 1(16,6)                        |
| CSI             | 14                       | 3(21,4)      | 7(50)                     | 0                          | 4(28,6)                        |
| Jardim Cristina | 3                        | 1(33,3)      | 1(33,3)                   | 0                          | 1(33,3)                        |
| Rubião Júnior   | 7                        | 3(42,8)      | 0                         | 0                          | 4(57,2)                        |
| Jardim Iolanda  | 5                        | 0            | 5(100)                    | 1(20)                      | 0                              |
| Aeroporto       | 8                        | 1(12,5)      | 4(50)                     | 1(12,5)                    | 3(37,5)                        |
| Vitoriana       | 2                        | 0            | 1(50)                     | 0                          | 1(50)                          |
| Peabirú         | 12                       | 0            | 7(58,3)                   | 0                          | 5(41,7)                        |
| Real Park       | 0                        | 0            | 0                         | 0                          | 0                              |
| César Neto      | 1                        | 0            | 1(100)                    | 0                          | 0                              |
| Marajoara       | 12                       | 4(33,3)      | 2(16,6)                   | 1(8,3)                     | 6(50)                          |
| Santa Elisa     | 2                        | 0            | 0                         | 0                          | 2(100)                         |
| Cohab           | 10                       | 3(30)        | 4(40)                     | 2(20)                      | 3(30)                          |
| <b>Total</b>    | <b>126</b>               | <b>24</b>    | <b>49</b>                 | <b>7</b>                   | <b>53</b>                      |

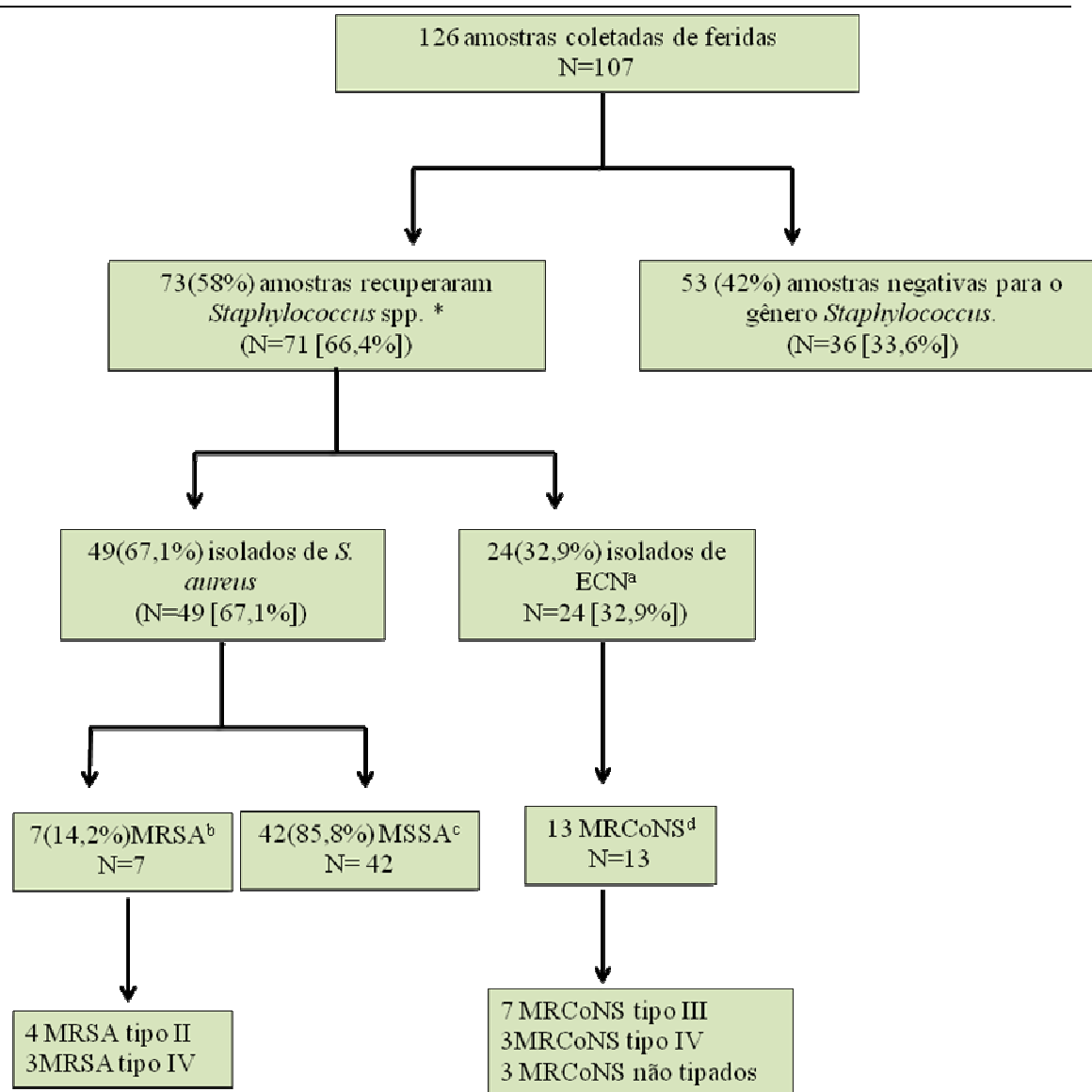
<sup>a</sup> porcentagem calculada sobre o número de *S. aureus*.<sup>b</sup> negativo para o gênero *Staphylococcus*.

De acordo com os resultados, houve predominância das úlceras venosas como diagnóstico de ferida, destes 5/71(7%) isolados foram MRSA, e ainda com 1/8(12,5%) isolado de MRSA em úlcera de pressão e 1/3(33,3%) em úlcera arterial e venosa (Tabela 11).

**Tabela 11:** Frequência das espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com o tipo de ferida.

| Classificação                | <i>S. aureus</i> |      | MRSA <sup>a</sup> |      | ECN <sup>b</sup> |      | Negativa para <i>Staphylococcus</i> spp. |             |
|------------------------------|------------------|------|-------------------|------|------------------|------|------------------------------------------|-------------|
|                              | N                | %    | N                 | %    | N                | %    | N                                        | %           |
| Úlcera venosa (71)           | 37               | 53,2 | 5                 | 13,5 | 9                | 12,6 | 25                                       | 35,2        |
| Úlcera de pressão (8)        | 2                | 25   | 1                 | 50   | 5                | 62,5 | 1                                        | 12,5        |
| Pé diabético (10)            | 5                | 50   | 0                 | 0    | 3                | 30   | 2                                        | 20          |
| Mal perfurante (3)           | 0                | 0    | 0                 | 0    | 2                | 66,6 | 1                                        | 33,3        |
| Úlcera arterial e venosa (3) | 1                | 33,3 | 1                 | 100  | 0                | 0    | 2                                        | 66,6        |
| Indefinida (12)              | 4                | 30,7 | 0                 | 0    | 5                | 38,4 | 4                                        | 30,7        |
| <b>Total</b>                 | <b>49</b>        |      | <b>7</b>          |      | <b>24</b>        |      | <b>36</b>                                | <b>33,6</b> |

<sup>a</sup>MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina<sup>b</sup>ECN: Estafilococos coagulase-negativa



<sup>a</sup>ECN: Estafilococos coagulase-negativa.

<sup>b</sup>MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

<sup>c</sup>MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina.

<sup>d</sup>MRCoNS: Estafilococos coagulase-negativa resistentes à meticilina.

\*Houve 2 pacientes que recuperaram das culturas um isolado de *S. aureus* e um de ECN.

**Figura 18:** Fluxograma dos resultados em relação à espécie, resistência a oxacilina, *mecA* e *SCCmec* de amostras isoladas de feridas de pacientes atendidos por unidades básicas de saúde do município de Botucatu.

#### 4.10 Análise Estatística

A avaliação da sensibilidade e da especificidade dos métodos fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina comparado com a detecção do gene *mecA* (padrão ouro), mostrou uma sensibilidade de 61,5% e especificidade de 90,9% para o disco de

cefotitina, e para o disco de oxacilina, a sensibilidade foi de 76,9% e especificidade de 90,9% para as espécies de ECN. Para as amostras de *S. aureus*, a sensibilidade para o disco de cefotitina e oxacilina foi de 100%, o mesmo ocorreu com a especificidade a ambas as drogas (**Tabela 12**).

**Tabela 12:** Comparação da presença do gene *mecA* com métodos fenotípicos de detecção da resistência a oxacilina e cefotitina por difusão de disco.

| Métodos     | ECN           |                | <i>S. aureus</i> |                |
|-------------|---------------|----------------|------------------|----------------|
|             | Sensibilidade | Especificidade | Sensibilidade    | Especificidade |
| Fenotípicos | %             | %              | %                | %              |
| Cefotitina  | 61,5          | 90,9           | 100              | 100            |
| Oxacilina   | 76,9          | 90,9           | 100              | 100            |

#### 4.11 Análise de Fatores de Risco do Hospedeiro para aquisição de *S. aureus*.

A análise univariada revelou como fator de risco para aquisição de *S. aureus* o uso de Benzilpenicilina [OR: 2,32 (1,05-5,10).  $p=0,04$ ], resultado que permanece na análise multivariada [OR: 2,88 (1,25-6,64)  $p=0,01$ ] (**Tabela 13**). Devido ao pequeno número de amostras de MRSA isoladas e a população estudada ter apresentado características homogêneas, não foi encontrado fator de risco para aquisição de MRSA.



**Tabela 13:** Análise univariada e multivariada dos fatores de risco para aquisição de *S. aureus*.

| Fatores de Risco                 | Univariada               |                |                                       |             | Multivariada            |             |
|----------------------------------|--------------------------|----------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
|                                  | <i>S. aureus</i><br>(49) | Outros<br>(58) | OR <sup>a</sup> (IC <sup>b</sup> 95%) | p           | OR(IC95%)               | p           |
| <b>Dados sociodemográficos</b>   |                          |                |                                       |             |                         |             |
| Sexo masculino                   | 18(36,7)                 | 21(36,2)       | 1,02(0,46-2,25)                       | 0,95        |                         |             |
| Idade, mediana                   | 70(44-95)                | 64(38-92)      | -                                     | 0,08        |                         |             |
| Casa própria                     | 43(87,8)                 | 47(81)         | 1,67(0,57-4,92)                       | 0,34        |                         |             |
| Menos que fundamental            | 39(79,6)                 | 50(86,2)       | 0,62(0,22-1,73)                       | 0,36        |                         |             |
| Água tratada                     | 47(95,9)                 | 55(94,8)       | 1,28(0,20-7,99)                       | 1,00        |                         |             |
| Esgoto tratado                   | 45(91,8)                 | 55(94,8)       | 0,61(0,13-2,88)                       | 0,70        |                         |             |
| Rua asfaltada                    | 44(89,8)                 | 53(91,4)       | 0,83(0,22-3,05)                       | 1,00        |                         |             |
| Renda familiar < R\$1000,00      | 12(24,5)                 | 22(37,5)       | 0,53(0,22-1,22)                       | 0,13        |                         |             |
| Zona urbana                      | 47(95,9)                 | 55(94,8)       | 1,28(0,20-7,99)                       | 1,00        |                         |             |
| Etilismo                         | 5(10,2)                  | 4(6,9)         | 1,53(0,38-6,06)                       | 0,72        |                         |             |
| Tabagismo                        | 6(12,6)                  | 6(10,3)        | 1,20(0,36-4,02)                       | 0,75        |                         |             |
| Prática de esportes              | 1(2)                     | 4(6,9)         | 0,28(0,03-2,60)                       | 0,37        |                         |             |
| Aposentado                       | 30(61,2)                 | 44(75,9)       | 0,50(0,21-1,15)                       | 0,10        |                         |             |
| Animal estimação                 | 30(61,2)                 | 28(48,3)       | 1,69(0,78-3,66)                       | 0,18        |                         |             |
| nº de pessoas casa               | 3(1-7)                   | 2(1-20)        | -                                     | 0,26        |                         |             |
| <b>Antibioticoterapia prévia</b> |                          |                |                                       |             |                         |             |
| Cefalexina                       | 39(79,6)                 | 44(75,9)       | 1,24(0,49-3,11)                       | 0,64        |                         |             |
| <b>Benzilpenicilina</b>          | <b>25(51)</b>            | <b>18(31)</b>  | <b>2,32(1,05-5,10)</b>                | <b>0,04</b> | <b>2,88 (1,25-6,64)</b> | <b>0,01</b> |
| Bactrin                          | 5(10,2)                  | 7(12,1)        | 0,82(0,24-2,79)                       | 0,76        |                         |             |
| Eritromicina                     | 5(10,2)                  | 1(1,7)         | 6,47(0,73-57,45)                      | 0,91        |                         |             |
| Clindamicina                     | 10(20,4)                 | 18(31)         | 0,57(0,23-1,38)                       | 0,21        |                         |             |
| Ciprofloxacino                   | 4(8,2)                   | 12(20,7)       | 0,34(0,10-1,13)                       | 0,07        |                         |             |
| Azitromicina                     | 2(4,1)                   | 0              | -                                     | 0,20        |                         |             |
| Gentamicina                      | 1(2)                     | 1(1,7)         | 1,18(0,72-19,49)                      | 1,0         |                         |             |
| Cloranfenicol                    | 1(2)                     | 2(3,4)         | 0,58(0,05-6,63)                       | 1,0         |                         |             |
| Amoxicilina                      | 6(37,5)                  | 10(17,2)       | 0,67(0,22-1,99)                       | 0,47        |                         |             |
| Norfloxacino                     | 6(12,2)                  | 8(13,8)        | 0,87(0,28-2,71)                       | 0,81        |                         |             |
| Metronidazol                     | 2(4,1)                   | 1(1,7)         | 2,42(0,21-27,58)                      | 0,59        |                         |             |
| Ampicilina                       | 2(4,1)                   | 4(6,9)         | 0,57(0,10-3,27)                       | 0,68        |                         |             |
| Levofloxacina                    | 0                        | 3(5,2)         | -                                     | 0,24        |                         |             |
| <b>Histórico de saúde</b>        |                          |                |                                       |             |                         |             |
| Diabetes                         | 18(36,4)                 | 18(31)         | 1,29(0,57-2,88)                       | 0,53        |                         |             |
| Hipertensão arterial             | 36(73,5)                 | 37(63,8)       | 1,57(0,68-3,60)                       | 0,28        |                         |             |
| Dislipidemia                     | 13(26,5)                 | 13(22,4)       | 1,25(0,51-3,02)                       | 0,65        |                         |             |
| Internação                       | 37(75,5)                 | 45(77,6)       | 0,89(0,36-2,18)                       | 0,80        |                         |             |
| Última internação                |                          |                |                                       |             |                         |             |
| Tempo de ferida, Mediana         | 48(1-576)                | 8(1-600)       |                                       | 0,22        |                         |             |
| Ferida de repetição              | 26(53,1)                 | 23(46,9)       | 1,72(0,79-3,71)                       | 0,16        |                         |             |
| Tipo de ferida                   |                          |                |                                       |             |                         |             |
| Uso de antibiótico               | 49(100)                  | 57(98,3)       | -                                     | 1,00        |                         |             |

<sup>a</sup>Odds Ratio.<sup>b</sup>Intervalo de Confiança.

*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

A incidência de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) tem aumentado continuamente dentro dos hospitais e, nos últimos anos, na comunidade. Nossos dados demonstram o atual espectro de colonização bacteriana em pacientes com feridas atendidos em unidades básicas de saúde do município de Botucatu. De acordo com o critério utilizado, todas as feridas apresentavam-se colonizadas, e a grande maioria (90,6%) caracterizada como crônicas. As culturas recuperaram em maior frequência *Staphylococcus* spp. em 73/126(58%) das amostras coletadas (n=71[66,4%]), e destas, 49/73(67,1%) isolados foram *S. aureus* e 24/73(32,9%) estafilococos coagulase-negativa. O gênero *Staphylococcus* é o mais comum isolado em lesões de pele, sendo a espécie *S. aureus* a bactéria mais isolada de feridas crônicas colonizadas ou infectadas.<sup>91-92</sup>

Gjodsbol et al.<sup>53</sup> verificaram o perfil bacteriano de úlceras venosas crônicas, todas colonizadas, por um período de 8 semanas, em que amostras foram coletadas a cada duas semanas e as espécies bacterianas presentes foram identificadas. Mais de uma espécie bacteriana foi detectada em todas as úlceras. As bactérias mais comuns foram o *S.aureus* (93,5%), *E. faecalis* (71,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (52,2%), estafilococos coagulase-negativos (45,7%), *Proteus* spp. (41,3%) e bactérias anaeróbias (39,1%).

Diferentes espécies de bactérias podem ser detectadas em feridas crônicas.<sup>91,53</sup> Essa microbiota pode ser proveniente do hospedeiro, do ambiente, ou ambas as fontes. No entanto, a presença de tais microrganismos não é obrigatoriamente associada a uma cicatrização retardada,<sup>94</sup> pois a cura de uma ferida crônica dependem de múltiplos fatores. Existem vários fatores sistêmicos e pessoais que afetam o processo de cicatrização da ferida. Como o comportamento do portador de ferida, não aderindo ao

---

tratamento, o tabagismo, abuso de álcool, as condições socioeconômicas que pode impedir a compra de regimes de tratamento adequados ou dispositivos, tendo que trabalhar em profissões de grande desgaste físico. E as comorbidades que afetam as funções metabólicas, nutricionais e imunes como o diabetes *melittus* e a hipertensão arterial.<sup>74</sup>

A resposta imunológica do hospedeiro é o determinante mais importante de infecção de ferida crônica. Fatores que afetam essa resposta incluem: 1) o tamanho e a localização da ferida, pois as grandes feridas e a localização em regiões difíceis de permanecerem limpas, tais como áreas plantar e perineal, têm um maior risco de infecção. 2) A idade das feridas, quando com mais de 6 semanas é associado à microbiota polimicrobiana e são mais propensas a desenvolver infecção de estruturas de tecidos profundos e ossos. 3) A perfusão do leito da ferida, sendo que a oxigenação inadequada favorece a proliferação microbiana, aumenta o risco de infecção e diminui a probabilidade de cura. 4) A presença de tecido desvitalizado que serve de fonte de nutrientes para as bactérias ou corpos estranhos de qualquer tipo, incluindo próteses ortopédicas, onde os microorganismos podem aderir.<sup>74</sup>

Dentre as espécies de ECN isoladas, o *S. epidermidis* apresentou maior frequência em feridas crônicas, assim como encontrado por Gjodsbol et al.<sup>53</sup> O *S. epidermidis* é a espécie de ECN mais frequentemente encontrada em pele e mucosas de seres humanos, isto provavelmente ocorre devido à sua capacidade de produzir bacteriocinas ativas contra outras bactérias Gram-positivas que poderiam competir por nichos de colonização.<sup>8</sup>

Mesmo que a presença de bactérias não seja responsável pela gênese de uma ferida crônica, estas podem ser um fator adicional no prolongamento da cicatrização fisiológica das feridas. Assim, a partir de uma colonização, inicialmente sem problemas,

---

uma infecção ou até mesmo uma sepse pode ocorrer em alguns pacientes.<sup>95</sup> Especialmente em pacientes com feridas crônicas, as dificuldades são agravadas pela crescente problemática do aumento de bactérias multiresistentes, como o *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA).

Portadores nasais e pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* têm sido descritos como fator de risco para o desenvolvimento de infecções, sendo que 11% a 43% dos pacientes colonizados adquirem infecção. A característica da infecção depende dos fatores de virulência do patógeno e de mecanismos de defesa do hospedeiro.<sup>93</sup>

Infelizmente, poucos estudos realizam a identificação das espécies de ECN, devido à baixa importância dada a estes microrganismos, por acreditarem que não estão envolvidos em infecções, apenas colonização. Apesar de considerados como agentes colonizadores e contaminantes de culturas de feridas, sabe-se que os ECN podem servir como fontes de genes de resistência e virulência para o *S. aureus*,<sup>96-98</sup> já que estes microrganismos apresentam uma taxa de resistência superior aos *S. aureus* em nosso estudo e em vários outros.<sup>99-100</sup>

Atualmente, mais de 70% dos isolados de ECN em todo o mundo são resistentes à oxacilina.<sup>101</sup> Além disso, as cepas de ECN adquiridas no hospital se tornaram resistentes a vários outros agentes antimicrobianos. Sader et al.<sup>102</sup> relataram uma frequência de resistência à oxacilina de 80% entre os isolados de ECN envolvidos em infecções da corrente sanguínea. Ferreira et al.<sup>103</sup> encontraram uma frequência de resistência à oxacilina de 64% entre as cepas ECN isoladas de diferentes locais clínicos. Nosso estudo colabora com esses achados, identificando 54,2% dos ECN resistentes à oxacilina.

Os resultados demonstram que a população de estudo é caracterizada por indivíduos idosos (mediana=68 anos), maioria do sexo feminino (63,6%), aposentados

---

(69,1%), com baixa escolaridade (83,1%), e com alguma comorbidade associada: 68,2% com hipertensão arterial, 33,6% com diabetes *mellitus* e 24,2% com dislipidemia.

Com o aumento da média de sobrevida, a população idosa continua a aumentar, e o mesmo acontece com o número de pacientes com diabetes *mellitus*. Os diabéticos apresentam um sistema imunológico mais vulnerável as infecções, devido à influência da hiperglicemia e acidose na diminuição da capacidade de fagocitose pelos polimorfonucleares, ocasionando alterações de opsonização, aderência e quimiotaxia dos leucócitos, alteração do sistema antioxidante e menor produção de interleucinas (IL2).<sup>104-105</sup>

Acima de 60 anos, há um retardo no processo de cicatrização que é agravado no caso de uma isquemia adicional, o que é muito comum nessa idade.<sup>106</sup> O Envelhecimento afeta todos os componentes da pele, incluindo a epiderme, derme e o subcutâneo. A atividade proliferativa da pele diminui com a idade, levando à diminuição da renovação da epiderme e afinamento da epiderme. Isso resulta em uma barreira menos eficaz, retardo na cicatrização, e maior risco de invasão por microorganismos.<sup>107-108</sup> Os macrófagos intradérmicos ou células de Langerhans, que são responsáveis pela imunidade celular, diminuem em quase 50% com o envelhecimento da pele.<sup>109</sup> O comprometimento da imunidade celular aumenta o risco de infecção.<sup>107,110</sup>

A derme perde aproximadamente 20% de sua espessura ao longo do tempo, principalmente devido à perda de colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, células nervosas, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas.<sup>108-110</sup> A perda de colágeno é devido a um aumento das enzimas de sua degradação e uma diminuição da atividade fibroblástica.<sup>108</sup> Alterações no colágeno predispõe a pele envelhecida a rasgar e lentifica cicatrização da ferida.<sup>107-108</sup>

---

Em estudo sociodemográfico com pacientes portadores de úlceras de estase, em Botucatu e região, também foi encontrado maioria mulheres, da cor branca, 93,4% estavam com 40 anos ou mais, 90% tiveram menos que 4 anos de estudo, 73,4% ganhavam menos que um salário mínimo, 35% aposentados, 2,5% recebendo auxílio doença e 4,2% desempregados. Em torno de 16% dos pacientes tiveram que se afastar do trabalho por tempo médio de 18,5 meses, 49,2% tiveram algum grau de incapacidade para o trabalho e 15,8% se aposentaram devido a ulcera com idade média de 54,8 anos, sendo que 64,2% dos pacientes tiveram recorrências e o tempo decorrido desde o primeiro episódio da ulcera foi em média 13,4 anos.<sup>111</sup>

A comparação do perfil da população deste estudo com o realizado por Abbade,<sup>111</sup> em 2001, na mesma região, mostra que permanece, durante os últimos dez anos, o perfil de paciente portador de ferida que é atendido tanto nas unidades básicas de saúde de Botucatu quanto no ambulatório da Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

As úlceras venosas foram predominantes dentre os diagnósticos (66,3%), seguido pelo pé-diabético (9,3%), úlceras de pressão (7,5%), úlcera arterial e venosa (2,8%) e mal-perfurante (2,8%). Resultados semelhantes ao encontrado por Martins et al.<sup>112</sup>, sendo as úlceras venosas a mais freqüente entre as feridas crônicas. Estima-se que a prevalência varia de 0,06%<sup>45</sup> a 2%<sup>113</sup>, dependendo do local, podendo atingir 4% em pessoas com mais de 65 anos.<sup>114</sup>

Alguns pacientes (12/107[11,2%]) tiveram suas feridas caracterizadas como indefinidas, não sendo encontrado no prontuário o diagnóstico médico. Isso ocorreu na maioria dos casos em que as feridas foram classificadas como feridas agudas, assim há a possibilidade dessas evoluírem para crônicas, já que muitos desses pacientes possuem fatores de risco para cronificação da ferida.

---

Neste estudo, a prevalência de MRSA, dentre os *S. aureus* isolados, foi de 6,5%. Kac et al.<sup>115</sup> avaliaram o estado de portador em feridas crônicas, e encontraram 19,5% de portadores de MRSA em 1994 e 20,5% em 1996. Outros estudos evidenciaram valores próximos aos encontrados por esse estudo, compreendendo valores entre 5,5%<sup>100</sup> a 8%.<sup>116</sup>

O estudo dos genes codificadores da PVL, demonstrou que nenhuma amostra de *S. aureus* carregava os genes, mesmos os isolados de MRSA SCCmec tipo IV. Outros trabalhos realizados no Brasil também corroboram com este achado.<sup>117-118</sup>

Os isolados de MRSA apresentaram resistência de 100% aos  $\beta$ -lactâmicos (oxacilina, cefoxitina e penicilina), 85,7% à eritromicina, 57,1% à clindamicina e levofloxacina e 14,2% à gentamicina. Garcia-Agudo et al.<sup>119</sup> também encontraram resistência elevada a fluorquinolonas (94,3%), eritromicina (87%) e clindamicina (65,3%).

Não foi encontrada resistência fenotípica aos discos de Linezolida, Quinupristina/Dalfopristina, Vancomicina e Tigeciclina, assim como encontrado por Garcia-Agudo et al.<sup>119</sup> O que demonstra que essas drogas são boas alternativas para tratamento de MRSA, no local de estudo.

A classificação do cassete cromossômico revelou cassetes do tipo II e IV em pacientes com infecções por MRSA, resultados similares aos obtidos por Bonesso<sup>100</sup>, realizado na região de Botucatu. Este resultado demonstra o perfil de resistência de MRSA de Botucatu e região. 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 multirresistente.<sup>4</sup> Apesar de no Brasil, o clone epidêmico brasileiro, SCCmec tipo IIIa, ser o mais freqüente,<sup>120-121</sup> este não foi encontrado em nosso estudo.



Todos os isolados de MRSA SCC*mec* tipo II (4/7) apresentaram resistência aos discos de levofloxacina, eritromicina e clindamicina. Houve um isolado resistente à gentamicina, e 3/4 dos isolados de MRSA tipo II demonstraram o mesmo perfil de resistência aos discos utilizados, sendo estes, coletados de UBSs distintas, o que sugere a presença de clones disseminando-se pelas unidades.

Quanto aos isolados de MRSA tipo IV (3/7), 2/3 apresentaram resistência a eritromicina e 1/3 à gentamicina, contrariando, estudos que demonstram a permanente susceptibilidade do CA-MRSA a vários antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos como o Trimetoprim-sulfametazol, clindamicina, tetraciclina e fluorquinolonas.<sup>122-123</sup>

A classificação dos cassetes cromossômicos ocorreu em 77% das amostras de MRCoNS. Outros estudos, utilizando a mesma técnica, também relataram dificuldades na tipagem de alguns cassetes,<sup>4,100,120-121,124</sup> fato que pode ser atribuído às novas estruturas no cassete decorrentes de rearranjos em regiões específicas.<sup>4</sup>

O MRCoNS SCC*mec* tipo III foi o mais predominante, assim como encontrado por outros autores<sup>89,121,125</sup>, seguido pelo tipo IV.<sup>121,125</sup> O MRCoNS tipo III apresentou resistência aos discos de levofloxacina (85,7%), gentamicina (71,4%), eritromicina (71,4%), clindamicina (71,4%) e trimetoprim-sulfametazol (57,1%). Houve três isolados de MRCoNS SCC*mec* tipo III, da mesma espécie, *S. epidermidis*, com perfil idêntico de resistência as drogas antimicrobianas testadas, sendo dois isolados da mesma UBS. A realização da tipagem molecular permitirá elucidar a presença de clones, tanto de MRSA quanto de MRCoNS disseminando entre as UBS de Botucatu.

Vale ressaltar que o SCC*mec* tipo III codifica um grande número de genes de resistência, informação epidemiologicamente importante para o controle de infecção, sabendo-se que os ECN podem ser o fator determinante na origem de novas cepas de MRSA.

---

Os isolados não tipados pela técnica apresentaram 100% de resistência a penicilina e eritromicina, 33,3% de resistência ao ácido fusídico e uma baixa resistência as outras drogas comparado aos tipos SCCmec IV e III. Os SCCmec tipo IV apresentaram resistência aos discos de oxacilina (100%), Trimetoprim-sulfametazol (66,6%), clindamicina (100%), eritromicina (100%), entretanto, apresentou baixa resistência ao disco de cefoxitina (33,3%). Contrariando a literatura, esse estudo demonstra altas taxas de resistência, a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, em MRCoNS SCCmec tipo IV, resultado que preocupa devido a alta facilidade de transferência horizontal deste tipo de cassete, principalmente se o destinatário for um *S. aureus*.

Apesar dos critérios de exclusão buscarem o maior isolamento de amostras de origem comunitária, a taxa de estafilococos com cassete classificado como hospitalar foi maior. Provavelmente, a realização de curativos nestes pacientes, tanto nas UBSs quanto em ambiente hospitalar, devido ao retorno em consultas em busca de especialidades ou internações, pode carrear bactérias mais resistentes de um ambiente para outro, já que os microrganismos estão disseminados tanto no hospital quanto na atenção primária.

O método de disco difusão com discos de oxacilina e cefoxitina apresentou 100% de sensibilidade e especificidade para o *S. aureus*, resultados similares aos encontrados por Matos et al.<sup>126</sup> Em geral, métodos fenotípicos convencionais têm demonstrado alta sensibilidade e especificidade na detecção de isolados de MRSA.<sup>127-128</sup> Já para os isolados de MRCoNS, a sensibilidade ao disco de oxacilina e cefoxitina, foi de 76,9% e 61,5%, respectivamente, e a especificidade foi de 90,9% para ambos discos. Para a detecção de resistência a oxacilina, o CLSI padroniza o uso do disco de cefoxitina, por ser um forte indutor do sistema regulatório *mecA*. Entretanto, devido ao encontrado, o uso apenas da cefoxitina para detecção de MRCoNS é questionado.

---

É importante considerar as taxas locais e os padrões de resistência aos antimicrobianos, fatores de risco individuais para aquisição de MRSA, e a história de tratamento ao selecionar um esquema empírico inicial com antibióticos. O uso de fluoroquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina) para o tratamento simples de infecções de pele e tecidos moles deve ser reservado para pacientes com hipersensibilidade a  $\beta$ -lactâmicos, dado o seu amplo espectro de atividade e crescente resistência bacteriana a esses agentes.<sup>129</sup> Com base na eficácia observada de outros antibióticos e o aumento de resistência as fluoroquinolonas, recomenda-se que o uso dessa classe de drogas ocorra apenas em casos de pacientes alérgicos a penicilina ou quando a resistência bacteriana seja conhecida.<sup>92</sup>

Embora a detecção do gene *mecA* seja considerado o “padrão ouro” para caracterização do MRSA, outras modalidades de resistência à meticilina têm também sido descritas em linhagens que não apresentam o gene *mecA* e são denominadas *borderline*. A resistência *borderline* pode ser devido a dois mecanismos, o primeiro seria a inativação de oxacilina mediada pela hiperprodução de  $\beta$ -lactamase<sup>130</sup> e o segundo é a resistência modificada, chamada de MOD-SA, mediada pela alteração das PBPs intrínsecas com afinidade para a oxacilina alterada.<sup>131</sup> Em nosso estudo, 97% de nossas amostras foram produtoras de  $\beta$ -lactamase. Montanari et al.<sup>132</sup> também encontraram resultados semelhantes, em estudo com 89 amostras de *S. aureus*, identificando 74 (83,1%) amostras produtoras de  $\beta$ -lactamase. A detecção da hiperprodução de  $\beta$ -lactamase pode colaborar para a escolha correta do tratamento, já que a ação da enzima pode ser inibida eficientemente pelo ácido clavulânico e pelo sulbactam adicionado ao tratamento com beta-lactâmicos.<sup>130</sup>

A técnica de coleta por swabs foi realizada de acordo com as recomendações da Organização Mundial das Sociedades de cicatrização de feridas (*world-organisation of*

*the wound healing societies*), com a tecnologia Levine.<sup>79</sup> Estudos comparativos com as três diferentes técnicas de swab na identificação de infecção em feridas crônicas, com swab utilizando o exsudato da ferida, a técnica em Z e a técnica de Levine, juntamente com uma amostra de tecido da ferida utilizando procedimentos qualitativos e quantitativos, mostraram que a técnica de Levine obteve resultados mais próximos à biópsia, fornecendo uma medida razoavelmente precisa da carga bacteriana da ferida, uma vez que eles são mais amplamente aplicáveis do que culturas de tecidos.<sup>133</sup>

O uso de benzilpenicilina revelou-se como fator de risco para aquisição de *S. aureus*. Esta é uma das drogas mais utilizadas na atenção primária,<sup>134</sup> principalmente, no tratamento de infecções de feridas crônicas. Atualmente, os *Staphylococcus* spp. apresentam, em todo o mundo, uma elevada resistência (acima de 60%) a penicilina G.<sup>135</sup> Esse achado relaciona-se com o uso abusivo dessa droga, observado na leitura dos prontuários dos pacientes incluídos no estudo, levando a morte dos *Streptococcus* e permanência dos *Staphylococcus aureus*.

O uso inadequado de antimicrobianos é preocupante tanto na atenção primária quanto no meio hospitalar. Dentro dos hospitais essa realidade é bem conhecida, devido à existência de comissões de controle de infecções relacionadas à saúde que atuam, entre outros, para o uso racional de antimicrobianos, buscando a diminuição dos casos de infecções por microrganismos multiresistentes. Já na atenção primária, a discussão é mais complexa, sendo muito difícil o acompanhamento do uso de antimicrobianos, dentre outros fatores, pelo número, organização e dispersão dos serviços.

O delineamento inicial desse estudo foi proposto com intuito de epidemiologicamente, identificar isolados de CA-MRSA. No entanto, a população abordada é atendida, freqüentemente, por instituições de saúde, o que caracteriza amostras associadas a cuidados de saúde (HA-MRSA).

---

O CA-MRSA é comumente definido por critérios epidemiológicos como qualquer infecção por MRSA diagnosticada na comunidade ou dentro de 48 horas de internação hospitalar, excluindo contato recente de cuidados de saúde, tais como cirurgia, diálise, ou utilização de dispositivos médicos.<sup>136</sup> Também pode ser definido pela presença de dois marcadores moleculares: *SCCmec* tipo IV e a presença de genes que codificam a PVL.<sup>34,137</sup> Estas definições são confusas, e carecem de especificidade. Além disso, há um cruzamento cada vez maior de CA-MRSA e HA-MRSA em ambientes comunitários e de saúde. Por exemplo, CA-MRSA emergiu como a principal causa de infecções hospitalares em alguns hospitais.<sup>138-139</sup> Por outro lado, HA-MRSA é agora freqüentemente relatado no cenário da comunidade com pacientes cada vez mais submetidos a procedimentos invasivos em centros ambulatoriais ou recebendo cuidados de saúde em casa. Devido a esses fatores, a definição de CA-MRSA não é adequada. Assim, para um problema de saúde pública que cresce rapidamente, o CA-MRSA paradoxalmente não tem uma definição que reflete sua epidemiologia em evolução, ou que claramente a distingue dos tradicionais HA-MRSA.

McCarthy et al,<sup>140</sup> compararam os fatores de risco para aquisição de HA-MRSA e CA-MRSA, considerando a susceptibilidade antimicrobiana e a definição epidemiológica para classificar as cepas em hospitalar ou comunitária. Entretanto, poucas diferenças foram encontradas entre CA-MRSA e HA-MRSA. Sugere-se que a invasão de CA-MRSA nos ambientes de cuidado à saúde e a crescente aquisição de resistência pelas cepas comunitárias contribua para a indiferença de fatores associados à HA-MRSA x CA-MRSA.

Deste modo, definir um isolado de MRSA em comunitário ou hospitalar não torna-se mais relevante, que conhecer seu perfil de resistência, virulência e dinâmica de

---

transmissão, informações fundamentais para ações de controle, prevenção e tratamento de infecções causadas por MRSA.

*Conclusões*



## 6. CONCLUSÕES

- *S. aureus* foi isolado na maioria das amostras coletadas de feridas de pacientes atendidos nas UBSs da cidade de Botucatu, sendo 14,2% MRSA, com a maioria apresentando SCCmec tipo II, seguido pelo SCCmec tipo IV.
  - Apesar da menor frequência com que foram isolados, os ECN apresentaram maior número de amostras resistentes e com o gene *mecA* (54,2%), com maior frequência do SCCmec tipo III.
  - Os isolados de MRCoNS SCCmec tipo IV, apresentaram alta taxa de resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, como Trimetoprim-sulfametazol, clindamicina e eritromicina.
  - A resistência a antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos foi encontrada tanto em cepas que carregaram o gene *mecA* quanto em amostras negativas para este. Amostras de ambas as espécies carregaram cassetes característicos da comunidade e de ambientes hospitalar.
  - A grande maioria dos isolados de *S. aureus* e ECN foi produtora de  $\beta$ -lactamase.
  - Os métodos fenotípicos de detecção da resistência a meticilina foram mais sensíveis e específicos para amostras de *S. aureus* do que para ECN.
  - Neste estudo, não foi encontrado amostra de *S. aureus* ou ECN carregando o gene da toxina PVL. Entretanto, outras investigações deverão ser realizadas para a pesquisa de outros genes de virulência nessas amostras.
  - Houve um perfil similar de resistência entre amostras de MRSA e MRCoNS, com mesmo cassette cromossômico, sugerindo a presença de clones difundindo-se pelas UBSs de Botucatu.
  - O uso de benzilpenicilina foi um fator de risco para aquisição de *S. aureus*.
-



## *Referências*

---

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray, PR et al. Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 264-282.
  2. Garrity GM. Bergey's Manual of systematic bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition: v.3: The low G+C Gram positives, Springer-Verlag. New York. ISBN 0-387-95041-9, 2006.
  3. Euzéby, JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus* [Internet]. [place unknown: publisher unknown]; [up dated 2011 june 8; cited 2011 june 25]. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>
  4. Martins A, Cunha MLRS. Methicilin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: Epidemiological and Molecular Aspects. Microbiol Immunol. 2007; 51: 787-795.
  5. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil E, Grundmann H, Spratt B. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:7687-7698.
  6. Williams REO. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Bacteriol Rev. 1963;27(1):56-71.
  7. Pereira, EPL, Cunha MLRS. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente a oxacilina em alunos de enfermagem. J Bras Patol Med Lab. 2009;45(5): 361-369.
  8. Trabulsi LR, Teixeira LM, Bueris V. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4<sup>o</sup> ed. São Paulo ( SP): Atheneu; 2005. p. 175-82.
  9. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez- Somolinos M, Bouza E. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. Antimicrobial Agent Chemother. 2004;48(11): 4240-4245.
  10. Lee YL, Cesario T, Gupta G, Flionis L, Tran C, Decker M, Thrupp L. Surveillance of Colonization and Infection with *Staphylococcus aureus* Susceptible or Resistant to Methicillin in a Community Skilled-Nursing Facility. Am J Infect Control. 1997; 25(4):312-321.
  11. Santos BMO. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. Rev latino-am enfermagem. 2000; 8(1): 67-73.
-

12. Natoli S, Fontana C, Favaro M, Bergamini A, Testore GP, Minelli S, Bossa MC, Casapulla M, Broglio G, Beltrame A, Cudillo L, Cerretti R, Leonardis F. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:83.
13. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.* 1999; 50: 223-236.
14. Jevons MP. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Brazilian Medical Journal.* 1961;1:124-125 apud Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzama H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292: 67-74.
15. Canela LCGCS. Cuidar/Cuidados de enfermagem na vigilância de colonização e infecção por MRSA (*Staphylococcus aureus* metilino resistente) em clientes imunocomprometidos por doença hematológica (dissertação). Rio de Janeiro (RJ): Escola de Enfermagem Anna Nery/ UFRJ; 2004.
16. Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 781-791.
17. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:135-6.
18. Silvert DM, Boulton ML. *Staphylococcus aureus* resistant vancomycin – EUA 2002. *MMWR.* 2002; 51(26): 565-567.
19. Baddour MM, Abuelkheir MA, Fatani AJ. Trends in antibiotic susceptibility patterns and epidemiology of MRSA isolates from several hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5: 30.
20. Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis* 2006;6:156.
21. Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discovery Today.* 2005; 10(1): 45-52.
22. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am J Infect Control.* 2003; 31: 481-98.

- 
23. Harbarth S, Rutschmann O, Sudre P, Pittet D. Impact of methicillin resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med. 1998; 158: 182-89.
  24. Niclaes L, Buntinx F, Banuro F, Lesaffre E, Heyrman J. Consequences of MRSA carriage in nursing home residents. Epidemiol Infect. 1999;122: 235- 39.
  25. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. Emerg Infect Dis. 1999; 5(1): 9-17.
  26. Jawetz, Melnick, Adelberg's. Microbiologia Medica. 21<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2000. p. 158-162.
  27. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5578-81.
  28. Boyle-Vavra S, Yin S, Challapalli M, Daum R. Transcriptional Induction of the Penicillin-Binding Protein 2 Gene in *Staphylococcus aureus* by Cell Wall- Active Antibiotics Oxacillin and Vancomycin. Antimicrob Agent Chemother. 2003; 47: 1028-1036.
  29. Katayama Y, Zhang Z, Chambers F. PBP 2a Mutations Producing Very- High-Level Resistance to Beta-Lactams. Antimicrob Agent Chemother. 2004; 48: 453-459.
  30. Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, Lencastre H. Epidemiology of Emerging Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a Nationwide Study in a Country with Low Prevalence of MRSA Infection. J Clin Microbiol. 2005; 43:1836-1842.
  31. Schulman G, Dassey D, Mascola L. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA. 2004; 280:421-422.
  32. Bratu S, David LD, Gupta J, Trehan M, Panwar M, Quale J. A population-based study examining the emergence of community-associated methicillin resistant *S. aureus* USA300 in New York City. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006; 5: 29.
  33. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. Rev Panam Infectol. 2005; 7(3):34-6.
  34. Ribeiro J, Boyce JM , Pedro Q. Zancanaro PQ. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. Braz J Infect Dis. 2005; 9(1):52-5.
-

- 
35. Bartlett J. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Other Drug-Resistant Pathogens CME. Infectious Diseases Society of América. Anual Meeting 2004.
  36. Domingues JT. It's Not a Spider Bite, It's Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Am Board Fam Med. 2004; 17: 220-226.
  37. Vandenesch F, Etienne J. How to prevent transmission of in the open community? Eurosurveillance. 2004; 9:5.
  38. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuza WAH, Hiramatsits K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat. 2003; 6: 41-52.
  39. International Working Group on the classification of Staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrob. Agents chemother, 2009. 4961-4967.
  40. Prevost G, Mourey L, Colin DA, Menestrina G. Staphylococcal pore-forming toxins. Curr Top Microbiol Immunol. 2001; 257: 53-83.
  41. Staali L, Monteil H, Colin DA. The Staphylococcal pore-forming leukotoxins open  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. J Membr Biol. 1998; 162: 209-216.
  42. Holmes A, Ganner M, Guane MC, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *S. aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization and association with clinical disease. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2384-2390.
  43. Dantas T, Nouer S. Emergencia de Transmissão hospitalar de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) associado com infecções comunitárias. Prática hospitalar. 2007; 51: 41-43.
  44. Gottrup F. A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. Am J Surg. 2004; 187: 38S-43S.
  45. Valencia IC, Falabella A, Kirsner RS, Eaglstein WH. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. J Am Acad Dermatol. 2001; 44: 401-421 quiz 422-424.
  46. Walmsley S. Advances in wound management: executive summary. Clinica Reports London: PJB Publications, Ltd.; 2002.
-

47. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. Brasília; 2002.
  48. Sibbald RG, Schultz GS, Coutts P, Keast D. Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation. *Ostomy Wound Manage.* 2003; 49: 24-51.
  49. Fowler E. Chronic wounds: an overview. In: Krasner D, editor. *Chronic wound care: a clinical source book for healthcare professionals*. King of Prussia, PA: Health Management Publications Inc; 1990. p. 12-8.
  50. Singh A, Halder S, Menon GR, Chumber S, Misra MC, Sharma LK, Srisvastava A. Meta-analysis of randomized controlled trials on hydrocolloid occlusive dressing versus conventional gauze dressing in the healing of chronic wounds. *Asian J Surg.* 2004; 27: 326-32.
  51. Brunnicardi F. *Charles Schwartz's principles of surgery* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2004.
  52. Stephens P, Wall IB, Wilson MJ, Hill KE, Davies CE, Hill CM, Harding KG, Thomas DW. Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. *Br J Dermatol.* 2003; 148(3):456-66.
  53. Gjødtsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogh KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J.* 2006; 3: 225-231.
  54. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010; 28: 519-526.
  55. Kingsley A. The wound infection continuum and its application to clinical practice. *Ostomy Wound Manage.* 2003; 49: S1-7.
  56. Laato M, Niinikoski J, Lundberg C, Gerdin B. Inflammatory reaction and blood flow in experimental wounds inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Eur Surg Res.* 1988; 20(1):33-38.
  57. Frank C, Bayoumi I, Westendorp C. Approach to infected skin ulcers. *Can Fam Physician.* 2005; 51: 1352-9.
  58. Salcido R. What is bioburden? The link to chronic wounds. *Adv Skin Wound Care.* 2007; 20(7): 368.
  59. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues.* 2002; 13: 382-97.
-

- 
60. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 244-69.
  61. Hohn DC, MacKay RD, Halliday B, Hunt TK. Effect of O<sub>2</sub> tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro. *Surg Forum.* 1976; 27: 18-20.
  62. Hopf HW, Hunt TK, West JM, Blomquist P, Goodson WH, Jensen JA, Jonsson K, Paty PB, Rabkin JM, Upton RA, von Smitten K, Whitney JD. Wound tissue oxygen tension predicts the risk of wound infection in surgical patients. *Arch Surg.* 1997;132(9):997-1005.
  63. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of wound infection and temperature group. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1209-1215.
  64. Reinert C, McCulloch JA, Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Type IV SCCmec Found in Decade Old Brazilian MRSA Isolates. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12(3):213-216.
  65. Robert S, Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Intern Med J.* 2005; 35: 97S-105S.
  66. Velázquez-Meza M E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Pública de Méx.* 2005; 47: 381-7.
  67. Egidio JM, Barros ML. Preliminary study of community-acquired *Staphylococcus aureus* infection in Manaus Hospital, Amazonia Region, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(6): 707-709.
  68. Aizen E, Ljubuncic Z, Ljubuncic P, Aizen I, Potasman I. Risk Factors for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in a Geriatric Rehabilitation Hospital. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62(10): 1152-1156.
  69. Braga IA, Pirett CCNS, Ribas RM, Gontijo Filho PP. Colonização de úlcera de pressão por bactérias multirresistentes: Fatores de risco e sua relação com o desenvolvimento de sepse em um Hospital Universitário de Minas Gerais. *Prática hospitalar.* 2007; 51: 23-27.
  70. Carvalho CBM, Neto RM, Aragão LP, Oliveira MMO, Nogueira MN, Forti AC. Pé Diabético: Análise Bacteriológica de 141 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48(3): 398-405.
  71. Goldstein EJ, Citron DM, Vesbit CA. Diabetic foot infections: Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes Care.* 1996; 19: 638-41.
-

72. Ruckley CV. Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcers. *Angiology*. 1997; 48(1): 67-9.
73. Ferreira AM, Santos I, Sampaio CEP. O cuidado de enfermagem nos procedimentos de coleta para análise microbiológica de feridas: aplicabilidade de duas técnicas. *Arq Ciênc Saúde*. 2004; 11(3): 137-41.
74. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). Woundpedia. [place unknown: publisher unknown]; [up dated 2011 july 20; cited 2011 july 26]. Available from: <http://woundpedia.com/>
75. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo demográfico. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010.
76. Brasil. Ministério da Saúde. Padronização da Nomenclatura no Censo Hospitalar. Portaria Nº 312 de maio de 2002.
77. Martins PAE. Avaliação de três técnicas de limpeza do sítio cirúrgico infectado utilizando soro fisiológico para remoção de microrganismos [dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, USP; 2000.
78. Levine NS, Lindberg RB, Mason Jr. AD, Pruitt Jr. BA. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wound. *J Trauma*. 1976; 16(2): 89-94.
79. Koneman EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr, WC. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
80. CLSI. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
81. David J, Pimentel JC, Freire RPA. Aspecto Fenotípico da Resistência dos Estafilococos à Clindamicina e Eritromicina. *NewsLab*. 2005; 70: 114-115.
82. Ghoshal U, Prasad KN, Singh M, Tiwari DP, Ayyagari A. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Infect Chemother*. 2004; 10: 86-89.
83. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 2240-2244.
84. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing



- 
- Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29:1128-32.
85. Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(7): 2155-2161.
86. Milheirico C, Oliveira DC, Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(9): 3374–3377.
87. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 1449-1458.
88. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. Braz J Infect Dis. 2001; 4(5): 163-170.
89. 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.
90. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. Am J Public Health. 1989; 79(3): 340-9.
91. Korber A, Schmid EN, Buer J, Klode J, Schadendorf D, Dissemond J. Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department. JEADV. 2010; 24:1017–1025.
92. Kish TD, Chang MH, Fung HB. Treatment of Skin and Soft Tissue Infections in the Elderly: A Review. Am J Geriatr Pharmacother. 2010; 8(6): 485-513.
93. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998; 339:520-532.
94. O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. Health Technol Assess. 2000; 4(21):1-237.
95. Miller M, Cook HA, Furuya EY, Bhat M, Lee M, Vavagiakis P, Visintainer P, Vasquez G, Larson E, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* in the Community: Colonization Versus Infection. PLoS ONE 4(8): e6708. doi:10.1371/journal.pone.0006708.
-

- 
96. Szewczyk EM, Rozalski M. *Staphylococcus cohnii* resident of hospital environment: cell-surface features and resistance to antibiotics. *Acta Microbiol Pol.* 2000; 49(2): 121-33.
  97. Wiolders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 357:1674-5.
  98. 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 Agent Chemother.* 2004; 48(1); 285–296.
  99. Souza Junior FC, Nunes EWF, Nascimento ED, Oliveira SM, Melo MCN, Fernandes MJBC. Prevalência de *Staphylococcus* spp resistentes à metilina isolados em uma maternidade escola da Cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009;42(2):179-182.
  100. Bonesso, MF. 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]. Botucatu/SP: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2011.
  101. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–1999. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32(Suppl. 2): S114–S132.
  102. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes ME, Zocolli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5: 200-214.
  103. Ferreira RBR, Nunes APF, Kokis VM, Krepsky N, Fonseca LS, Bastos MCF, Giambiagi-DeMarval M, Santos KRN. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 42: 205-212.
-

- 
104. 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.
  105. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff MC, Allanic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. Diabet Med. 1997;14(1):29-34.
  106. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. Am J Surg. 2004; 187 (Supl to May 2004): 65S-70S.
  107. Diggory P, Homer A, Liddle J, Pratt CFW, Samadian S, Tozer R, Weinstein C. Medicine in the elderly. Postgrad Med J. 1991;67: 423-445.
  108. Htwe TH, Mushtaq A, Robinson SB, et al. Infection in the elderly. Infect Dis Clin North Am. 2007; 21:711-743.
  109. Norman RA. Geriatric dermatology. Dermatol Ther. 2003; 16: 260-268.
  110. O'Donnell JA, Hofman MT. Skin and soft tissues. Management of four common infections in the nursing home patient. Geriatrics. 2001; 56: 33-38.
  111. Abbade LPF. Estudo sociodemográfico e clínico dos pacientes portadores de ulcera de estase [dissertação]. Botucatu/SP: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2001.
  112. Martins MA. Avaliação de feridas crônicas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde de Goiânia [dissertação]. Goiania/GO: UFG; 2008.
  113. Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. Br J Surg. 1994; 81: 167-173.
  114. Callam MJ, Ruckley CV, Harper DR, Dale JJ. Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care. Br Med J (Clin Res Ed). 1985; 290: 1855-1856.
  115. Kac G, Buu-Hoi A, Hérisson E, Biancardini P, Debure C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial acquisition and carrier state in a wound care center. Arch Dermatol. 2000, 136: 735-739.
  116. 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.
  117. Mímica MJ, Berezin EN, Damaceno N, Carvalho RB. SCCmec Type IV, PVL-Negative, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis Patients from Brazil. Curr Microbiol. 2011; 62: 388-390.
-

- 
118. Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, Santos LCG, Conceição MS, Mello Junior SJ, Carballido JM, Rito PN, Vieira VV, Teixeira LA, Figueiredo MAS. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmec IV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 65: 300-305.
  119. García-Agudo L, Vaquero MH, Egea MAA, González RC, García-Martos P. Sensibilidad a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina procedentes de pacientes ambulatorios. *Rev Esp Quimioter*. 2011; 24(2):91-95.
  120. Perez LRR, D'Azevedo PA. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. *Rev Inst Med trop S. Paulo*. 2008; 50(3):135-137.
  121. De Souza AG. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Staphylococcus coagulase-negativa* isolados de infecções de corrente sanguínea de pacientes de dois hospitais gerais da cidade de São Paulo. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2009.
  122. Gelatti LC, Sukiennik T, Becker AP, Inoue FM, Carmo MS, Castrucci FMS, Pignatari ACC, Ribeiro LC, Bonamigo RR, Azevedo PA. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. *Soc Bras Med Trop*. 2009; 42: 458-460.
  123. 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.
  124. Thong KL, Junnie J, Liew FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibigrams and Molecular Subtypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Local Teaching Hospital, Malaysia. *J Microbiol Biotechnol*. 2009; 19(10): 1265–1270.
  125. Zong Z, Peng C, Lu X. Diversity of SCCmec Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS ONE*. 2011;6(5): e20191. doi:10.1371/journal.pone.0020191.
  126. Matos PDM, Schuenck RP, Cavalcante FS, Caboclo RMF, Santos KRN. Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCCmec types. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(7): 931-934.
-

- 
127. Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2005;55: 379-382.
  128. Baddour MM, AbuElKheir MM, Fatani AJ. Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Microbiol. 2007; 55: 473-509
  129. Fung HB, Chang JY, Kuczynski S. A practical guide to the treatment of complicated skin and soft tissue infections. Drugs. 2003; 63:1459-1480.
  130. McDougal LK, Thornsberry C. The Role of  $\beta$ -Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. J Clin Microb. 1986; 23(5): 832-839.
  131. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother. 1989; 33: 1869-74.
  132. Montanari MP, Tonin E, Biavasco F, Varaldo PE. Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin binding proteins. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34: 911-3.
  133. Gardner SE, Frantz RA, Saltzman CL, Hills SL, Park H, Schedubel M. Diagnostic validity of three swab techniques for identifying chronic wound infection. Wound Repair Regen. 2006; 14(5): 548-557.
  134. Abrantes PM, Magalhães SMS, Acúrcio FA, Sakurai E. Avaliação da qualidade das prescrições de antimicrobianos dispensadas em unidades públicas de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002. Cad Saúde Pública. 2007; 23(1):95-104.
  135. Robinson D, Enright MAC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(12): 3926-3934.
  136. Centers for Disease Control and Prevention: Diagnosis and Testing of MRSA Infections. [up dated 2011 july 20; cited 2011 july 26]. Available from: <http://www.cdc.gov/mrsa/diagnosis/index.html>.
-

137. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community- acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8): 978-984.
  138. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:647-56.
  139. Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:236-42.
  140. McCarthy NL, Sullivan PS, Gaynes R, Rimland D. Health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A comparison of definitions. *Am J Infect Control.* 2010; 38(8): 600-606.
-

*Anexos*

---

## ANEXO A

### QUESTIONÁRIO

UBS: \_\_\_\_\_

Data coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### A. Dados pessoais:

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

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Tel.s: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

#### B. Condições socioeconômicas:

1. Renda familiar mensal: \_\_\_\_\_

2. Moradia ( ) própria ( ) alugada ( ) outro \_\_\_\_\_

3. n° de pessoas na casa: \_\_\_\_\_

4. Água tratada ( ) sim ( ) não

5. Esgoto tratado ( ) sim ( ) não

6. Rua asfaltada ( ) sim ( ) não

7. Luz elétrica ( ) sim ( ) não

8. Zona Rural ( ) Zona urbana ( )

9. Nos últimos 12 meses foi admitido em alguma instituição abaixo?

( ) Clínica de repouso/reabilitação

( ) Asilo

( ) Presídio

( ) Tiro de guerra

( ) Time esportivo

( ) Nenhuma

10. Pratica algum esporte? ( ) sim ( ) não ; Qual? \_\_\_\_\_

11. Faz uso de drogas ilícitas? ( ) sim ( ) não

12. Alcoolismo ( ) sim ( ) não; Tabagismo ( ) sim ( ) não

13. Possui animal de estimação? ( ) não ( ) sim, Qual(s)? \_\_\_\_\_,

#### C. Histórico:

1. Você já teve alguma infecção anterior que necessitou de tratamento com antibiótico(s)?

( ) Não ( ) Sim, Qual(is) antibiótico(s) foi(ram) utilizado(s)? \_\_\_\_\_

2. Você possui alguma dessas patologias?

( ) Diabetes, tipo \_\_\_\_; ( ) Pressão alta; ( ) Colesterol alto,

( ) outros \_\_\_\_\_

3. Como surgiu sua(s) ferida(s)? \_\_\_\_\_



Quanto tempo ela(s) tem? \_\_\_\_\_, É de repetição? ( )sim ( )não

4. Fez ( ) e/ou faz ( ) uso de antibióticos devido à ferida? ( )sim ( )não;

Há quanto tempo foi o último uso? \_\_\_\_\_

Qual(is) usou? \_\_\_\_\_

5. Fez exames microbiológicos? ( )sim ( )não, Qual(s) \_\_\_\_\_

6. Já foi internado alguma vez na vida? ( )sim ( )não

Quanto tempo faz desde a última internação? \_\_\_\_\_ motivo: \_\_\_\_\_

7. Tipo de ferida:

( ) úlcera arterial

( ) pé-diabético

( ) úlcera venosa (estase)

( ) úlcera de pressão

( ) úlcera mista

( ) Queimadura

( ) Outras \_\_\_\_\_

**D. Características da Ferida(s):** *(Será preenchido pelo pesquisador)*

( )Edema ( )Eritema ( )Calor ( )Dor ( )Secreção purulenta ( )Febre ( )outra \_\_\_\_\_

Cobertura em uso: \_\_\_\_\_ Tempo de uso: \_\_\_\_\_

Sítio anatômico: \_\_\_\_\_

Tamanho: \_\_\_\_\_

Aspecto/descrição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Foto: ( )S ( )N

---

**ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa científica**

CONVIDO você a participar do Projeto de Pesquisa intitulado: CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE FERIDAS EM PACIENTES ATENDIDOS EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DA CIDADE DE BOTUCATU”, que tem como objetivo verificar se sua ferida possui uma bactéria chamada *Staphylococcus aureus*. Essa bactéria é muito encontrada em feridas, causa grandes infecções, principalmente, dentro dos hospitais, também é facilmente transmitida para outras pessoas e possui grande capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Isso faz com que o tratamento e a cura da ferida se tornem mais difíceis.

Para você participar, você terá que permitir que a pesquisadora faça uma limpeza de sua ferida com soro fisiológico, removendo as possíveis sujidades e, depois, com um swab (que parece um cotonete), realize um esfregaço pressionando levemente a ferida. Após a conclusão do trabalho todas as amostras isoladas dos pacientes serão mantidas congeladas. Você terá que responder um questionário contendo perguntas sobre seus dados de identificação (idade, sexo, ocupação, etc.), condições socioeconômicas (renda familiar, saneamento básico, etc.), história de sua saúde (doenças, infecções, etc.) e de sua ferida (origem, tratamento, etc.). Também pedimos permissão para tirar foto de sua ferida.

A sua participação neste estudo contribuirá para o maior conhecimento sobre essa bactéria e seus mecanismos de resistência, permitindo assim a busca por melhorias no tratamento e cura de feridas.

Suas informações serão utilizadas somente no projeto de pesquisa e sua identidade será mantida em sigilo. A pesquisadora estará disponível para responder quaisquer perguntas e você poderá retirar sua participação no estudo, a qualquer momento.

Botucatu, \_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Pesquisadora: Eliane Patricia Lino Pereira

DECLARO que fui satisfatoriamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, e concordo em participar da mesma, permitindo a coleta de material da(s) minha ferida(s) com um swab, respondendo as perguntas apresentadas no questionário e permitindo que fotografem minha ferida. Por estar de acordo, assino este presente termo.

Botucatu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Ass. do Sujeito à Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Ass. (pais ou responsável legal)

\_\_\_\_\_  
Ass. testemunha (caso

analfabetismo)

Esclarecimentos adicionais poderão ser obtidos com a pesquisadora pelo telefone: 3811- 6058

Endereço e telefone do pesquisador: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3811-6058/ 17- 9713 9827; fliane24@yahoo.com.br.

Endereço e telefone da orientadora: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, tel. 14 – 3811-6058; cunhamlr@ibb.unesp.br.

1ª via – arquivo; 2ª via – sujeito da pesquisa

---

## ANEXO C



**Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu**



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de abril de 2009.

Of. 89/09-CEP

Ilustríssima Senhora  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Ribeiro Souza da Cunha  
Departamento de Micro e Imuno do  
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Prof<sup>a</sup> Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, **(Protocolo CEP 3127-2009) "Caracterização da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de feridas de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Botucatu"**, a ser conduzido por Eliane Patrícia Lino Pereira, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 06/04/2009.

Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.