

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Botucatu

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Programa de Pós – Graduação em Doenças Tropicais

Lígia Maria Abraão

**Deteção dos genes de virulência e identificação do perfil clonal de
isolados de *Staphylococcus aureus* colonizantes de nasofaringe
obtidos em estudo de base populacional**

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

Orientador: Prof^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Prof^o. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu – São Paulo

2013

Lígia Maria Abraão

**Detecção dos genes de virulência e identificação do perfil clonal de
isolados de *Staphylococcus aureus* colonizantes de nasofaringe
obtidos em estudo de base populacional**

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

Orientador: Prof^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Co-orientador: Prof^o. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Botucatu – São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Abraão, Lígia Maria.

Detecção dos genes de virulência e identificação do perfil clonal de isolados de *Staphylococcus aureus* colonizantes de nasofaringe obtidos em estudo de base populacional / Lígia Maria Abraão. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Capes: 21202010

1. Estafilococos aureos. 2. Mucosa nasal - Infecções. 3. Epidemiologia Molecular. 5. Fatores de risco. 6. Resistência. 7. Virulência (Microbiologia).

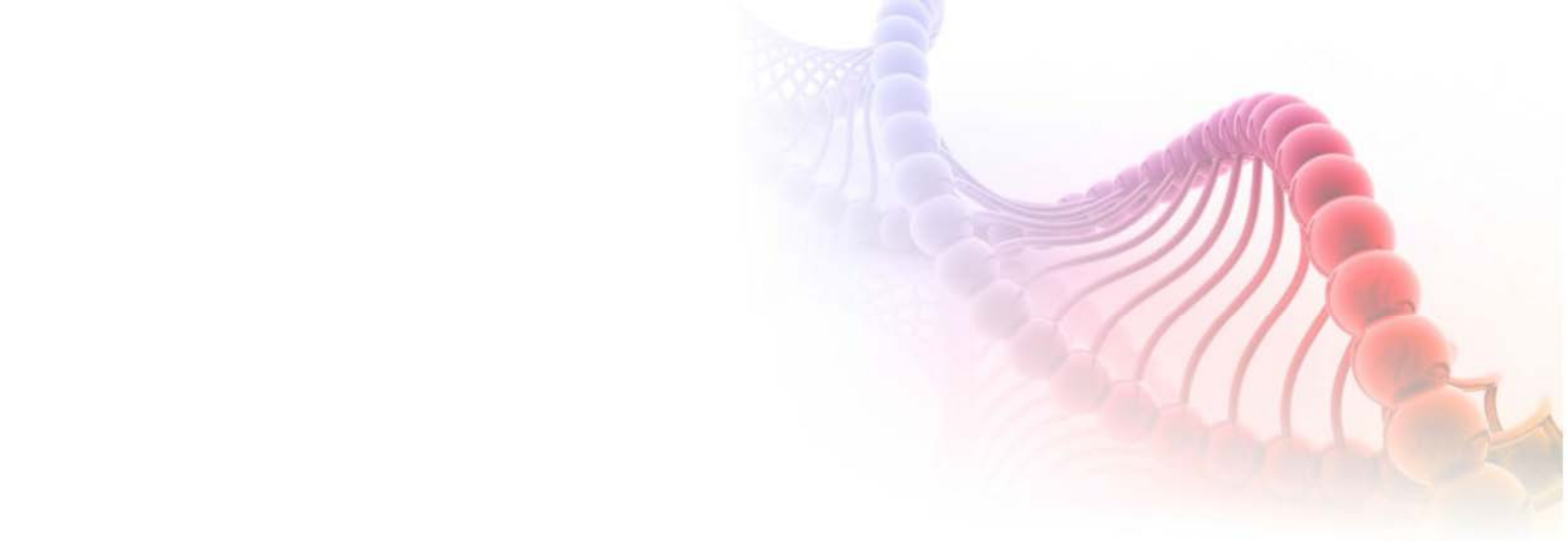
Palavras-chave: Carreamento nasal; CA-MRSA; Fatores de risco; Genes de virulência; MRSA; *Staphylococcus aureus*.



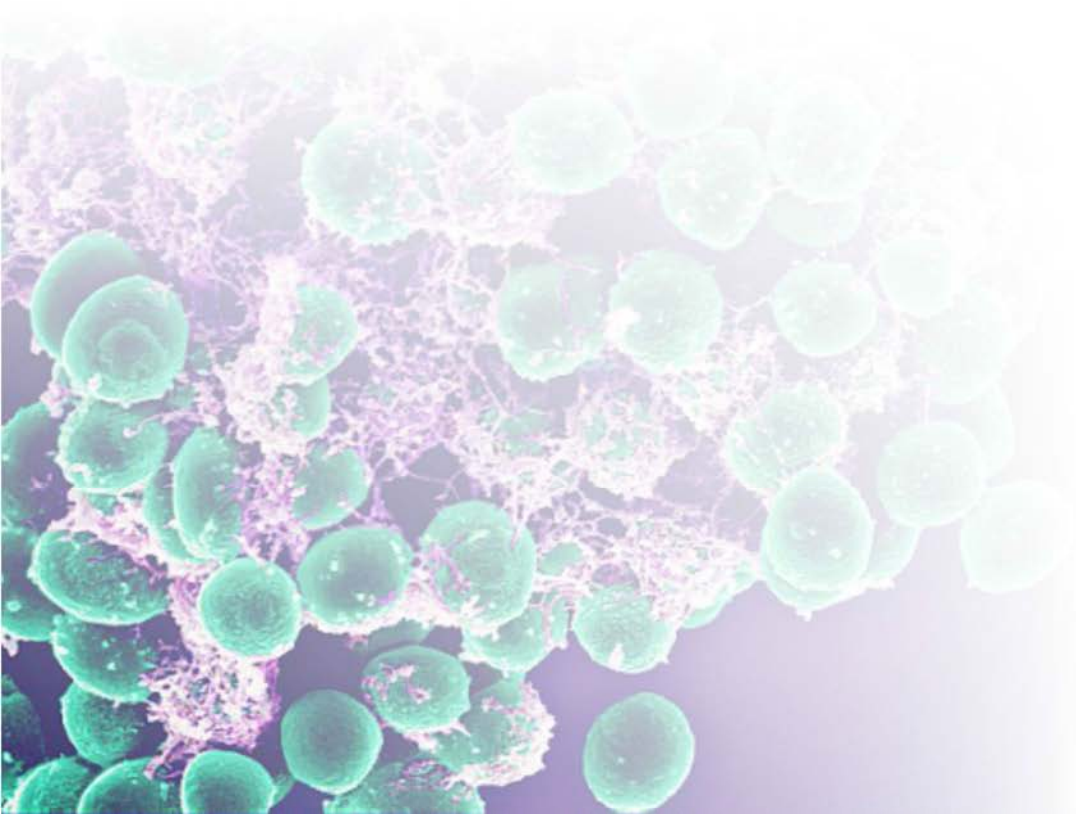
“ S e eu vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

I saac N ewton





Dedicatória



À minha querida mãe **M**ara, pelo amor incondicional, pelo carinho e apoio constantes, pelo exemplo de mulher, de caráter, dedicação e profissionalismo que sempre me impulsionou a seguir em frente. **P**ela compreensão aos meus inúmeros momentos de ausência. **P**or se desdobrar muitas vezes para poder me auxiliar, por sempre estar ao meu lado em toda e qualquer circunstância. **P**elo suporte sem o qual eu não conseguiria ter chegado até aqui.

Ao meu pai, **M**ário **A**ugusto, pelo amor, apoio e carinho, por se orgulhar da filha mesmo sem compreender ao certo sua área de atuação.

Aos meus irmãos **A**line e **G**uilherme, simplesmente por existirem e fazerem parte da minha vida. **P**or me proporcionarem tantas alegrias e por me apoiarem, estando sempre na torcida pelo alcance dos meus objetivos e sonhos.

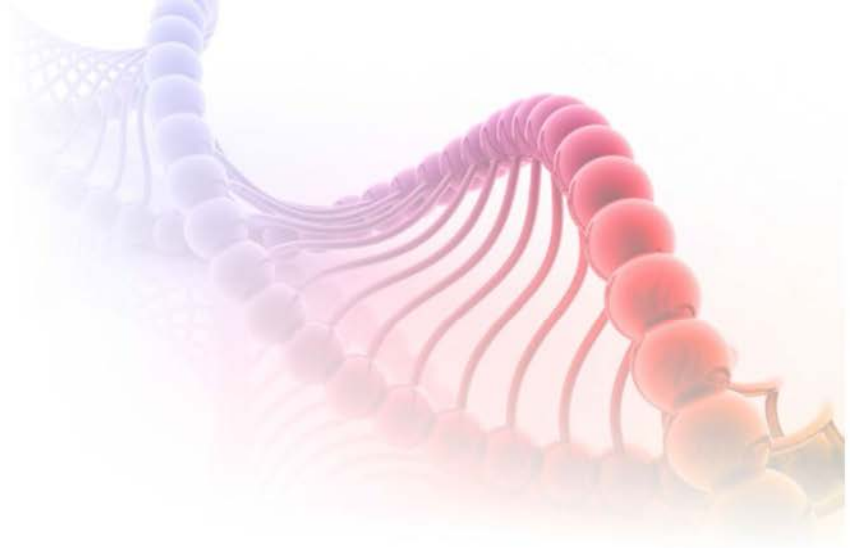
A família abençoada que **D**eus me deu: **A**vó **I**rene e **A**vô **J**osé **R**oberto (in memorian), **A**vó **M**aria **B**enedita (in memorian), **T**ia **G**uinha, **T**io **C**lodoaldo e **T**ia **J**ane, pelo amor e carinho, pelo suporte, pelas orações, por torcerem por mim e estarem sempre prontos a ajudar quando necessário. **P**or acreditarem desde muito cedo que eu poderia render bons frutos.

Ao meu grande amigo **W**esley (in memorian), que tanto me apoiou, torceu e incentivou, mas não teve tempo suficiente para acompanhar minha trajetória, por ter sido recolhido tão cedo e tão bruscamente desse mundo. **A**gradeço a **D**eus pelo privilégio de ter convivido com uma pessoa tão excepcional.

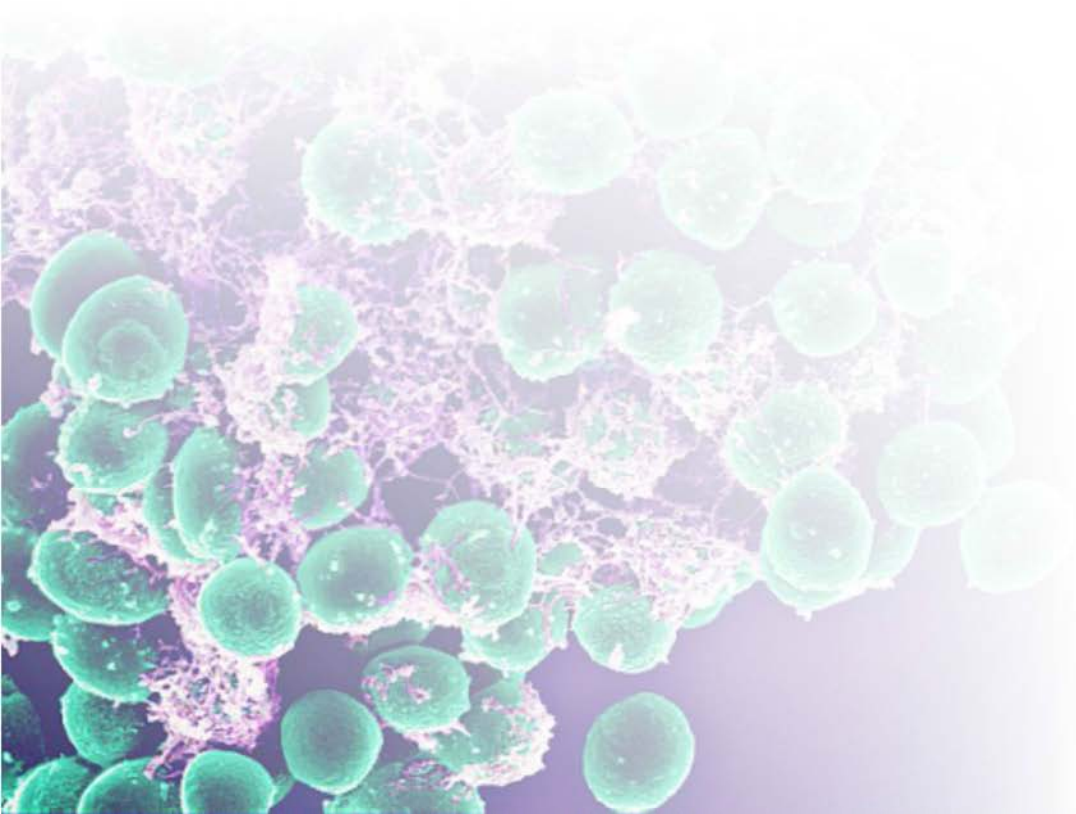
As minhas ex-professoras da graduação, hoje amigas: **M**arilisa, **V**iviane, **T**atiana e **J**ovira, pelo aprendizado que me proporcionaram, pelo carinho, incentivo, motivação e por acreditarem que eu poderia alçar vãos maiores.

Amo vocês!





Agradecimientos



A Deus, razão pela qual existo, vivo e tenho forças para seguir em busca dos meus objetivos e sonhos. Pela Fé e perseverança que me proporciona a cada dia, que me permitem acreditar em coisas que parecem impossíveis aos olhos do homem. Pela força que não me permite desabar nos momentos de adversidades, pelos momentos, oportunidades e pelas portas que foram abertas em minha vida. Enfim, por tudo!

Aos meus Pais: Mara e Mário, por tudo que fizeram e que ainda fazem por mim, pelo amor sincero, pelo zelo, pela torcida mais preciosa que existe, pela educação e suporte sem os quais eu jamais teria chegado a algum lugar.

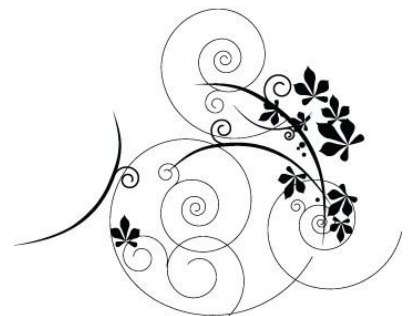
Aos meus irmãos Aline e Guilherme, por serem tão especiais comigo, pelo amor incondicional, pelo auxílio e cuidado de sempre, pelo apoio e por me proporcionarem tantos momentos de alegria, descontração e diversão. Tenho orgulho de ser irmã de vocês!

À minha Avó Irene, pelo amor, cuidado, carinho e preocupação. Pelo suporte que sempre me oferece, pelo exemplo vivo de amor ao próximo que me dá com suas ações diárias.

À minha Tia Guinha (Ana) pelo carinho, preocupação, pelas orações constantes e por acreditar na realização dos meus sonhos.

Aos meus Tios Clodoaldo e Jane pelo carinho, suporte e pela torcida

À Família Sallom, em especial ao grupo de jovens, com os quais eu pude aprender e amadurecer ao longo desses anos. Agradeço pelo amor de vocês, pelo cuidado, pela comunhão, por todas as orações e também pelas amizades sinceras que me permitiram conquistar.



Aos meus queridos amigos de longas datas: *Cris Naves, Joseana, Fernanda Catane, Manuel Mário, Karina Chamma e Anita*, pelo bem que me proporcionam através dessa amizade sincera, pelo carinho, apoio, auxílio, pelas alegrias, pelo aprendizado e por tudo que vivenciamos. *Vocês são muito especiais!*

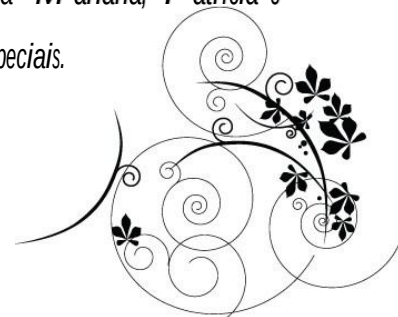
Aos amigos distantes: *Ana Paula Dantas, Patrícia Zamian, Maria Fernanda, Paulo Fernando, Elizabete, Heloisa e Marina*, pelo carinho, pelo suporte e pela forte torcida, ainda que seja à distância! *Vocês fazem muita falta...*

À todos os meus professores da *Graduação e Pós-Graduação*, pelo aprendizado, pelas experiências e pelo suporte que me impulsionam e capacitam a seguir em frente.

À minha orientadora *Profª. Lurdinha*, por ter aberto generosamente as portas de seu *Laboratório*, por ter acreditado em mim, oferecendo oportunidades e suporte para que eu obtivesse crescimento. *Pela preocupação, atenção e paciência de sempre, por ser exemplo de garra, determinação e profissionalismo. Obrigada por tudo!*

Ao meu co-orientador *Prof. Carlos Magno*, pelo suporte, pela atenção de sempre e por todo aprendizado que me proporciona. *Também pelo auxílio prestado ao longo do curso de mestrado, incluindo as análises estatísticas que contribuíram para realização e finalização desse trabalho.*

Aos meus amigos e colegas do populoso *Laboratório de Bacteriologia*: *Adilson, Aydir, Camila, Carla, Danilo, Eliane, Katheryne, Luiza, Luisa, Taísa, Natália, Valéria, Priscila, Ira e Cláudia*, por toda ajuda dispendida, pela amizade, pelo companheirismo, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelo aprendizado mútuo ao longo do desenvolvimento desse trabalho. *Em especial a minha parceira de projeto Fabiana*, por toda ajuda e pelos inúmeros momentos de risos e alegrias, ao *Carlos* pela ajuda, pelo ensino minucioso de várias técnicas, pelo incentivo, apoio e amizade e a *Mariana, Patrícia e Maria Rachel*, pelo auxílio, carinho, torcida e por terem se tornado amigas tão especiais.



As amigas da F undibio, M árcia e L idiane, pela convivência, apoio, carinho e amizade.

Aos funcionários, alunos e professores do D epartamento de M icrobiologia e I munologia, pela assistência, pelo carinho e pela prontidão com a qual prestam os serviços.

Aos F uncionários do D epartamento de D oenças T ropicais pela atenção e por todo auxílio prestado.

Às meninas do L aboratório de S aúde P ublica, pelo subsídio e operacionalização das coletas, possibilitando a realização dessa pesquisa.

À S eção técnica de P ós- G raduação pela simpatia e atenção com as quais recebem os alunos, pela prontidão em sanar duvidas e resolver problemas pertinentes, e por todo serviço prestado.

À S olange, secretária do P rograma de P ós- G raduação em D oenças T ropicais, pela simpatia de sempre, pela atenção e preocupação, pela paciência e por todo auxílio despendido ao longo desse período.

À B anca do E xame G eral de Q ualificação composta pela P rof^a. L enice do R osario de S ouza e pelo P rof. A ry F ernandes J únior, pelas colocações e sugestões que foram de grande valia, contribuindo para coma melhoria desse trabalho.

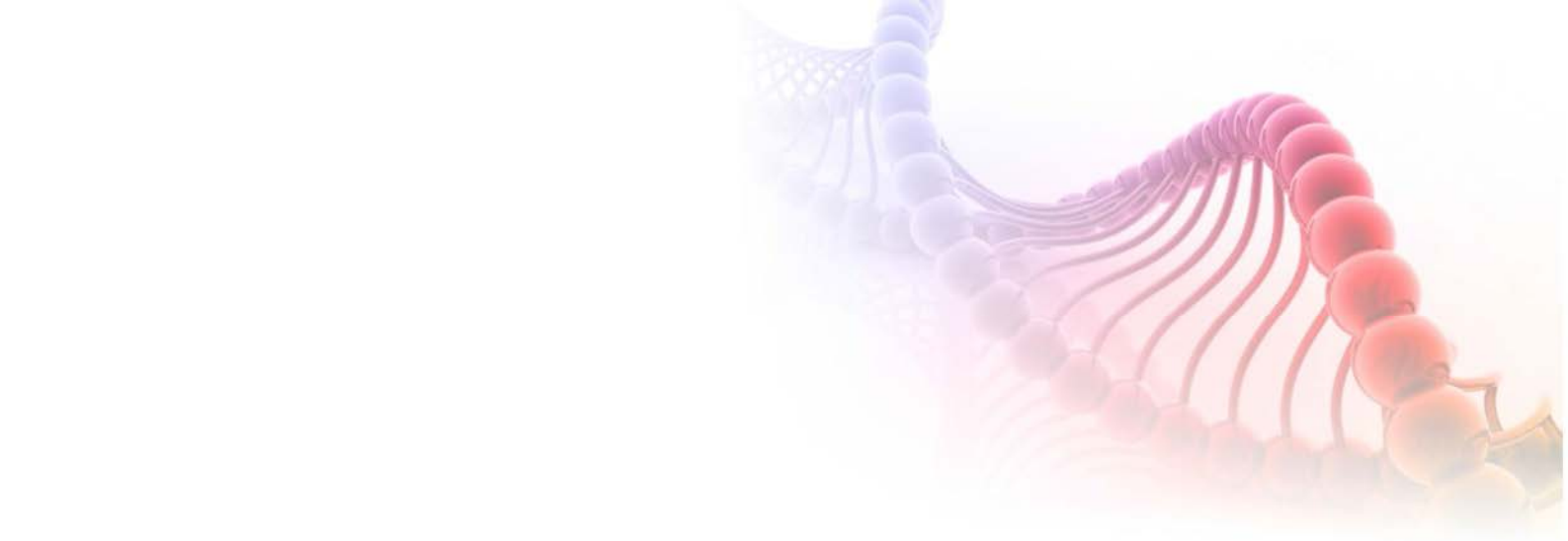
À C oordenação de A perfeiçoamento de P essoal de N ível S uperior – C A P E S , pelo suporte financeiro prestado.

À F undação de A mparo a P esquisa do E stado de S ão P aulo – F A P E S P , pelo apoio financeiro referente à bolsa de mestrado, processo: 2011/13818-6.

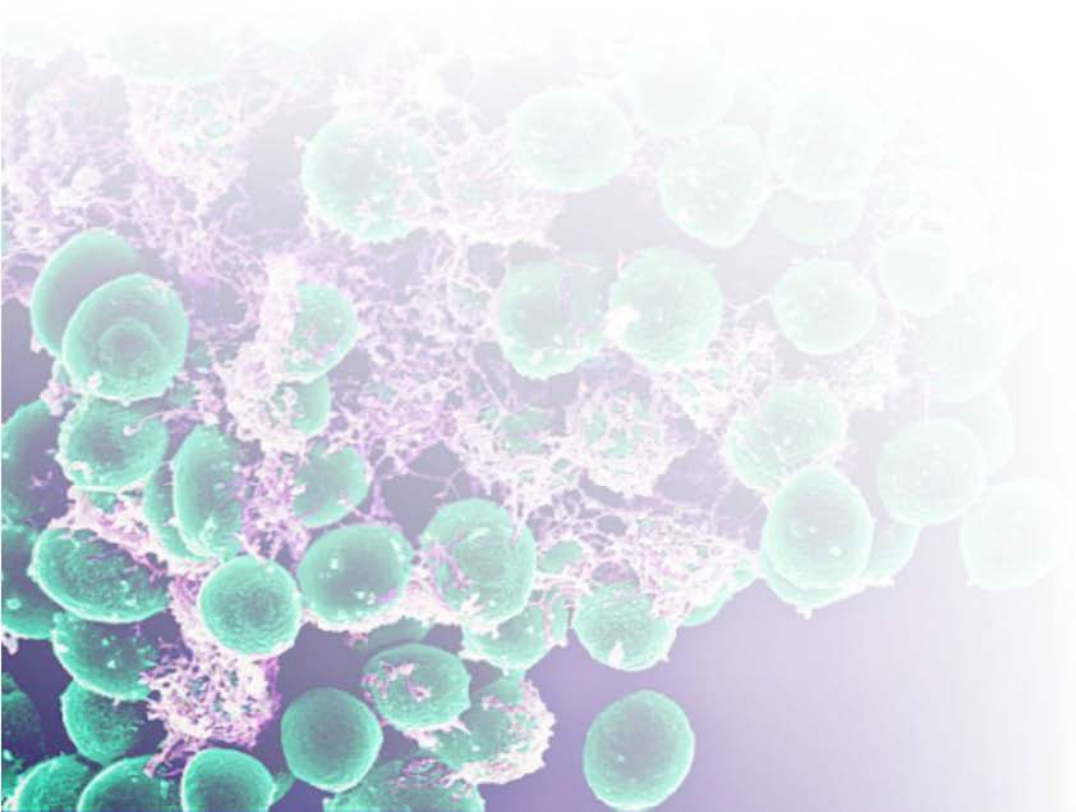
A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o alcance de mais essa etapa em minha vida.

Obrigada!





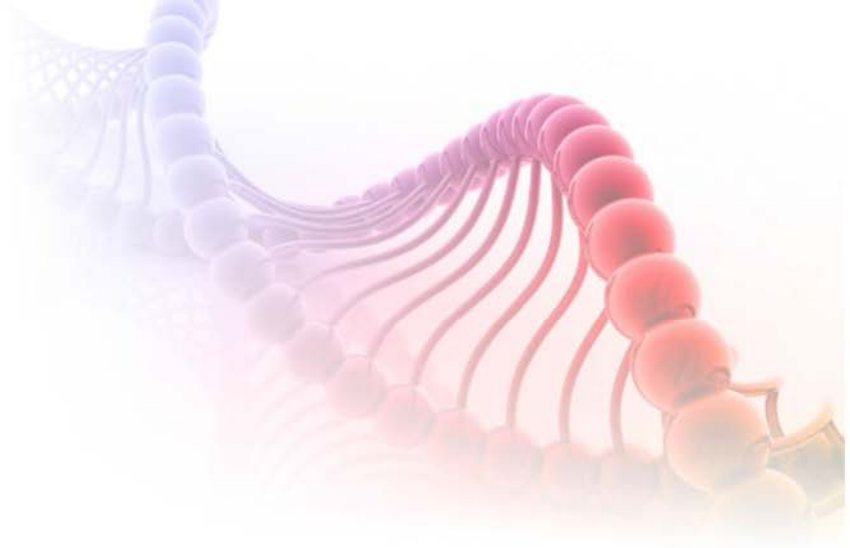
Sumário



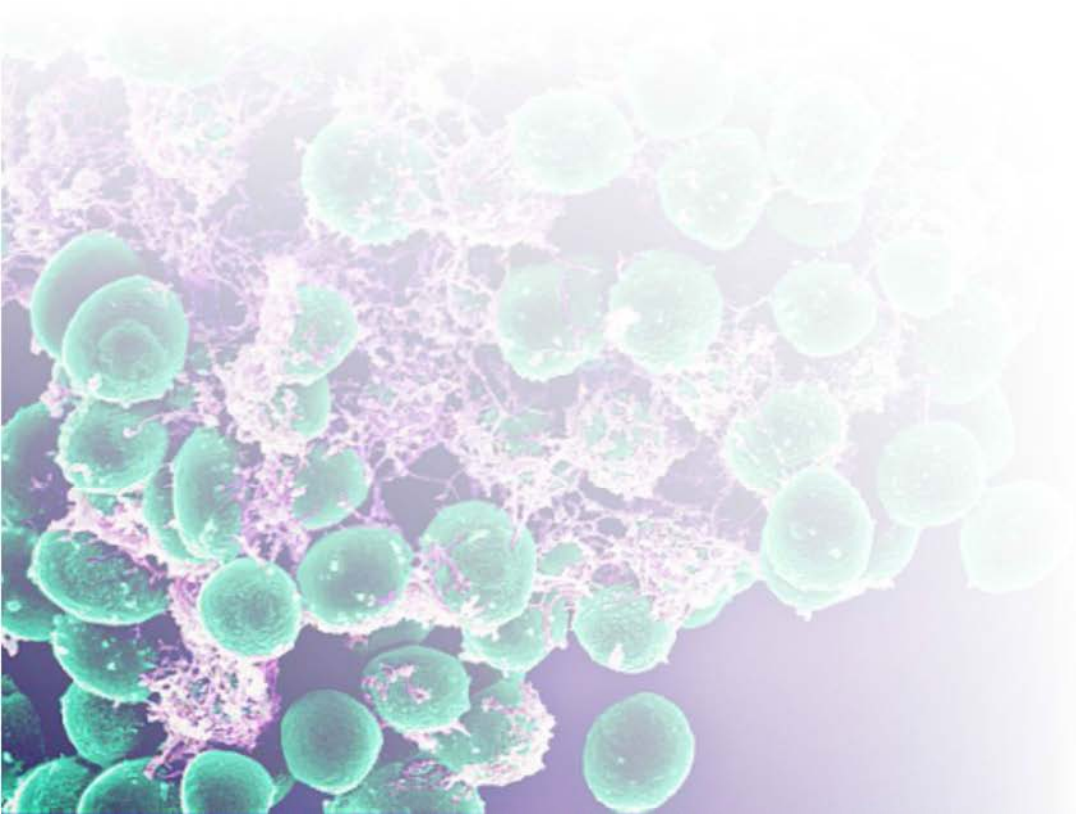
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO – Considerações Iniciais.....	1
1.1	Considerações Iniciais	1
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> : epidemiologia, patogênese, resistência antimicrobiana e relevância clínica.....	1
1.3	Estudos de base populacional sobre colonização/infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.4	Cenário Nacional.....	9
2	JUSTIFICATIVA.....	11
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	Objetivo Geral.....	12
3.1	Objetivos Específicos.....	12
4	METODOLOGIA.....	13
4.1	Local do Estudo.....	13
4.2	População do Estudo	14
4.3	Operacionalização.....	15
4.4	Coleta de dados demográficos e clínicos.....	15
4.5	Coleta de espécimes microbiológicos.....	16
4.6	Identificação da espécie.....	16
4.7	Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos.....	17
4.8	Extração do ácido nucleico para pesquisa genotípica.....	18
4.9	Deteção do gene <i>mecA</i> e caracterização de SCC <i>mec</i>	18
4.10	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>	19
4.11	Pesquisa de genes de virulência.....	21
4.12	Análise estatística dos resultados.....	23
5	CONSIDERAÇÕES ACERCA DA METODOLOGIA	24

5.1	Orientações aos sujeitos da pesquisa.....	24
6	RESULTADOS.....	26
6.1	Amostragem.....	26
6.2	Determinação da sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos.....	26
6.3	Detecção do gene <i>mecA</i> (de resistência à meticilina) e caracterização do <i>SCCmec</i>	28
6.4	Distribuição dos genes de virulência.....	29
6.5	Identificação dos fatores de risco.....	29
6.6	Perfil clonal dos isolados de <i>S. aureus</i> (tipagem por PFGE).....	32
7	DISCUSSÃO.....	37
8	CONCLUSÃO	43
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
10	ANEXOS.....	54
	Anexo A. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	54
	Anexo B. Questionário aplicado aos sujeitos da pesquisa.....	58
	Anexo C. Aprovação do Comitê de Ética.....	61

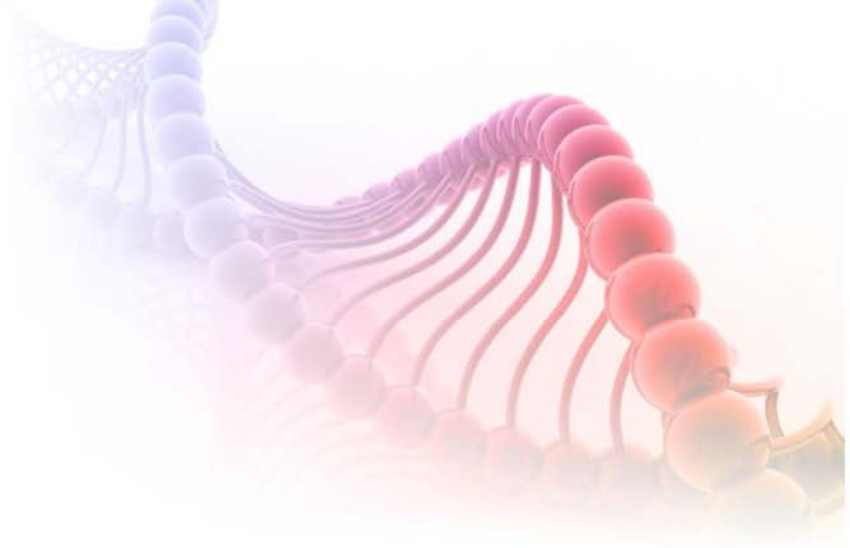


Lista de Figuras

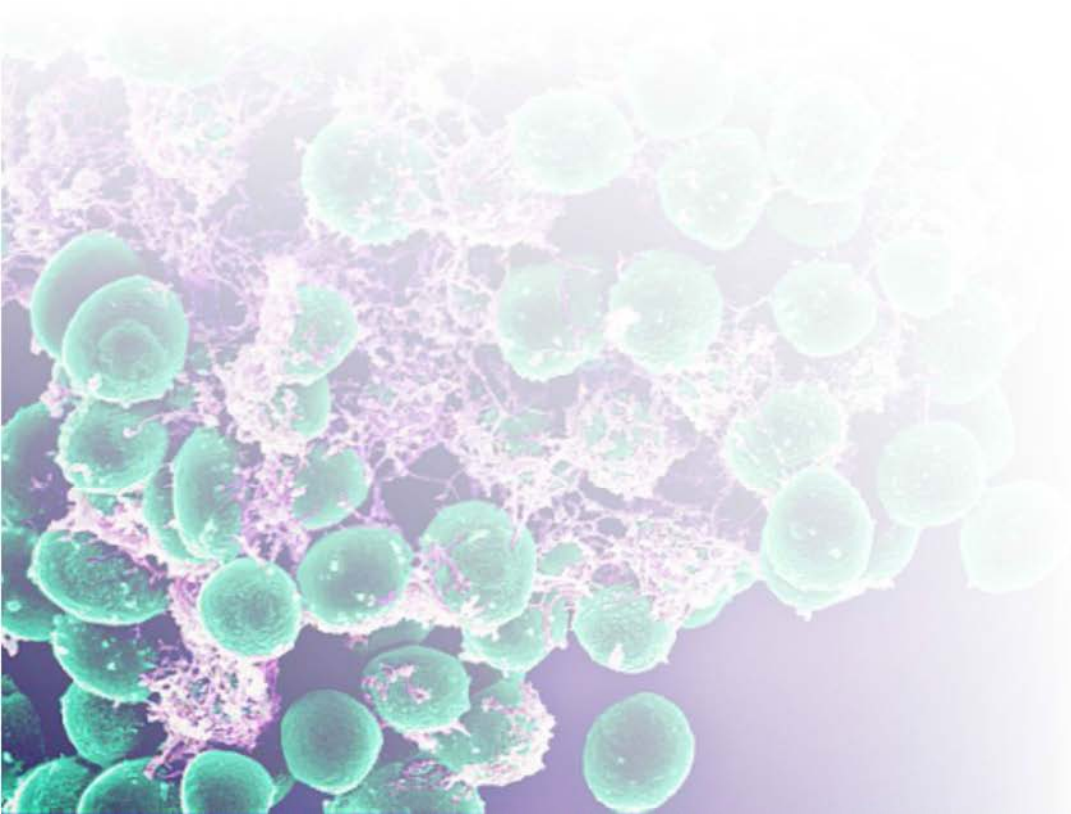


LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do município de Botucatu.....	13
Figura 2. Distribuição das 686 amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas a partir de 686 coletadas com <i>swabs</i> nasais em indivíduos hígidos do município de Botucatu..	26
Figura 3. Presença do gene <i>mecA</i> em amostras colonizantes nasais de <i>S. aureus</i>	28
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de <i>S. aureus</i> , <i>mecA</i> positivas.....	28
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 2%, (corado com SYBR® Safe) evidenciando produtos amplificados do <i>SCCmec</i> em <i>S. aureus</i>	29
Figura 6. Distribuição dos genes de virulência em amostras de <i>S. aureus</i>	30
Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (<i>Bionumerics Applied Maths</i>), dos perfis PFGE - <i>SmaI</i> de 195 isolados de <i>S. aureus</i> e MRSA.....	34-5
Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (<i>Bionumerics Applied Maths</i>), dos perfis PFGE - <i>SmaI</i> de isolados de CA-MRSA e cepas relacionadas (sensíveis).....	36

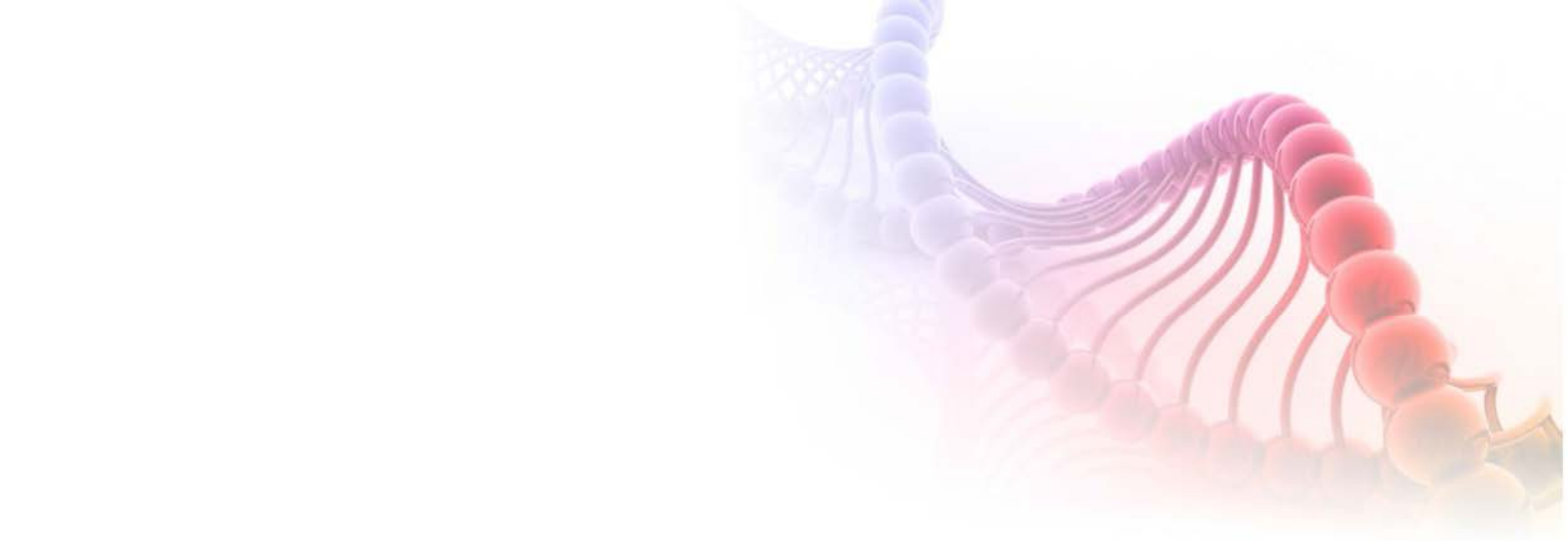


Lista de Quadros

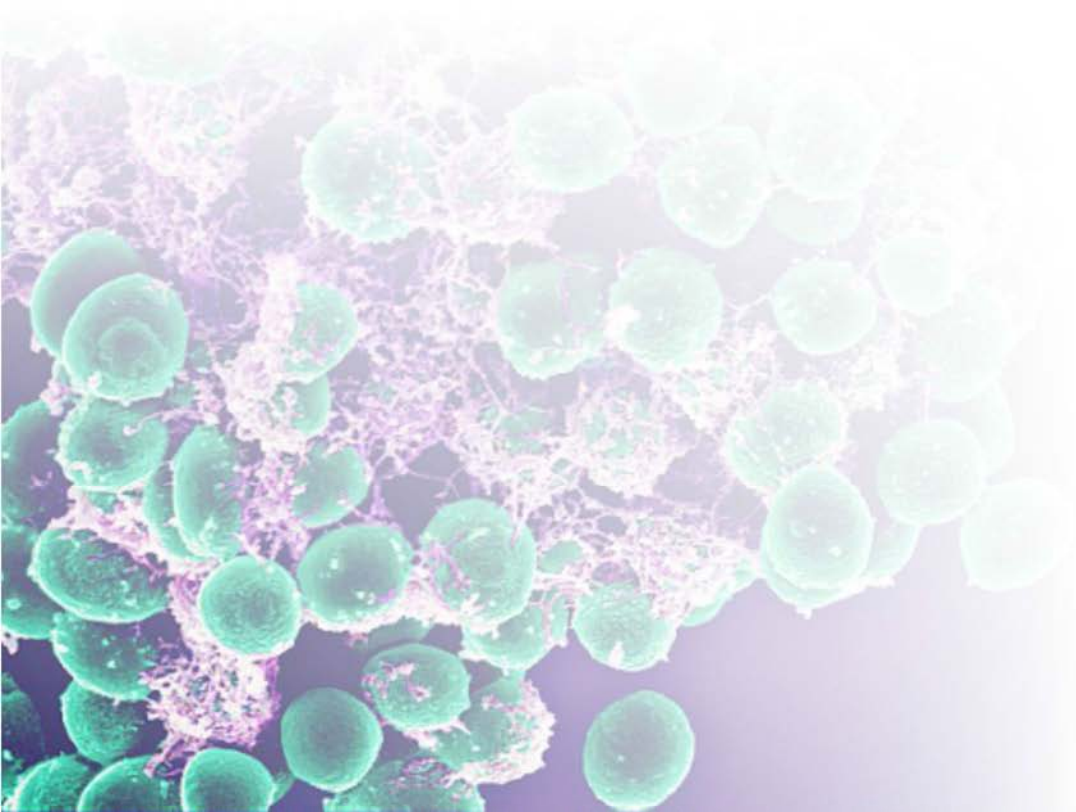


LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais síndromes infecciosas causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	1
Quadro 2. Diferenças entre MRSA e CA-MRSA.....	6
Quadro 3. Oligonucleotídeos para a detecção de genes do RNAr 16 S e SA442.....	17
Quadro 4. Limites da concentração inibitória mínima (µg/mL) para categorização de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Quadro 5. Oligonucleotídeos para a detecção do Cassete Cromossômico Estafilocócico MEC (SCCmec).....	19
Quadro 6. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de virulência.....	22

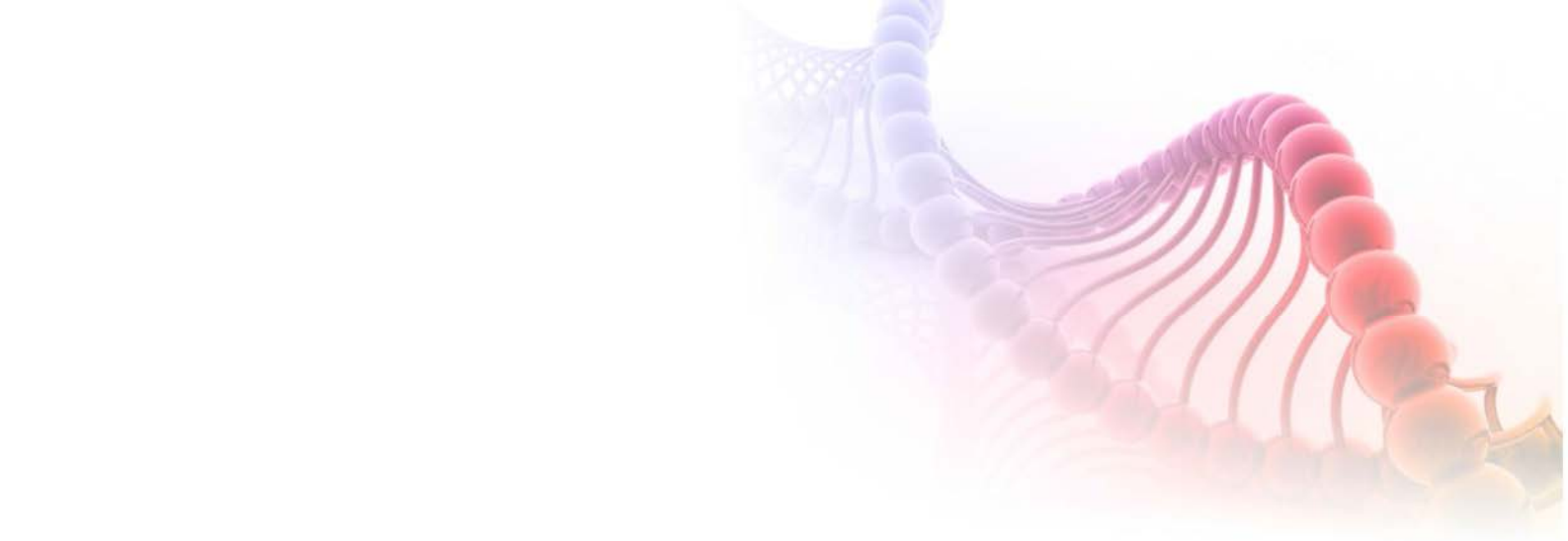


Lista de Tabelas

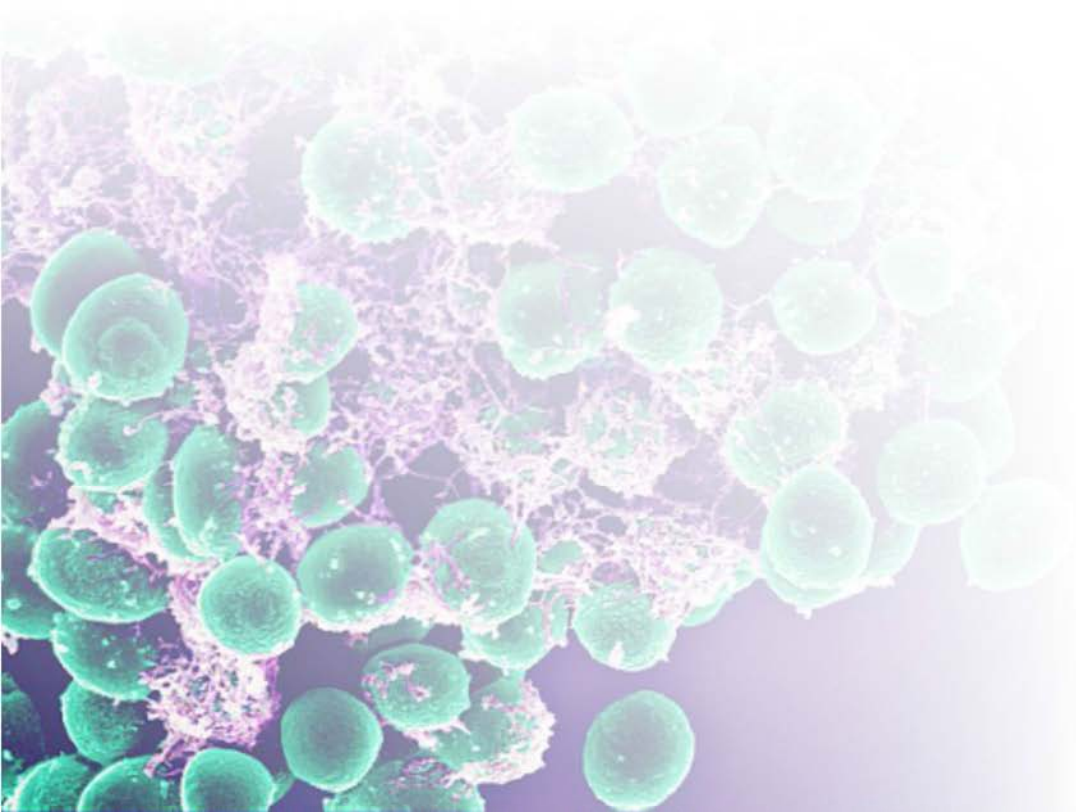


LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação da susceptibilidade antimicrobiana pelos métodos de disco-difusão e E-test.....	27
Tabela 2. Perfil de resistência das amostras de MRSA, obtido através do método de disco-difusão com as drogas Levofloxacina, Gentamicina, Clindamicina, Eritromicina, Sulfametoxazol, Penicilina e teste D.....	27
Tabela 3. Resultados de regressão linear univariada (método <i>Backward Stepwise Conditional</i>) para fatores de risco associados ao número de genes de virulência.....	31
Tabela 4. Resultados de regressão linear univariada (método <i>Backward Stepwise Conditional</i>) para fatores de risco associados ao número de genes de virulência.....	31
Tabela 5. Principais clusters identificados associados à presença de genes de virulência.....	33



Resumo

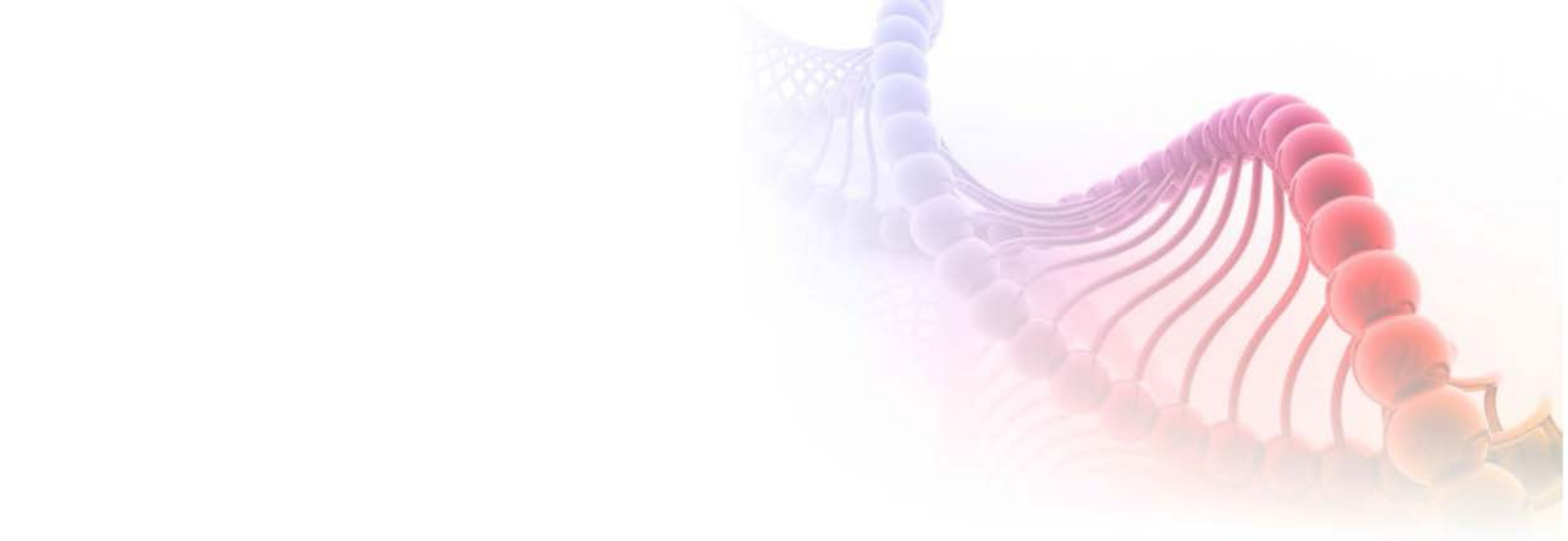


Resumo

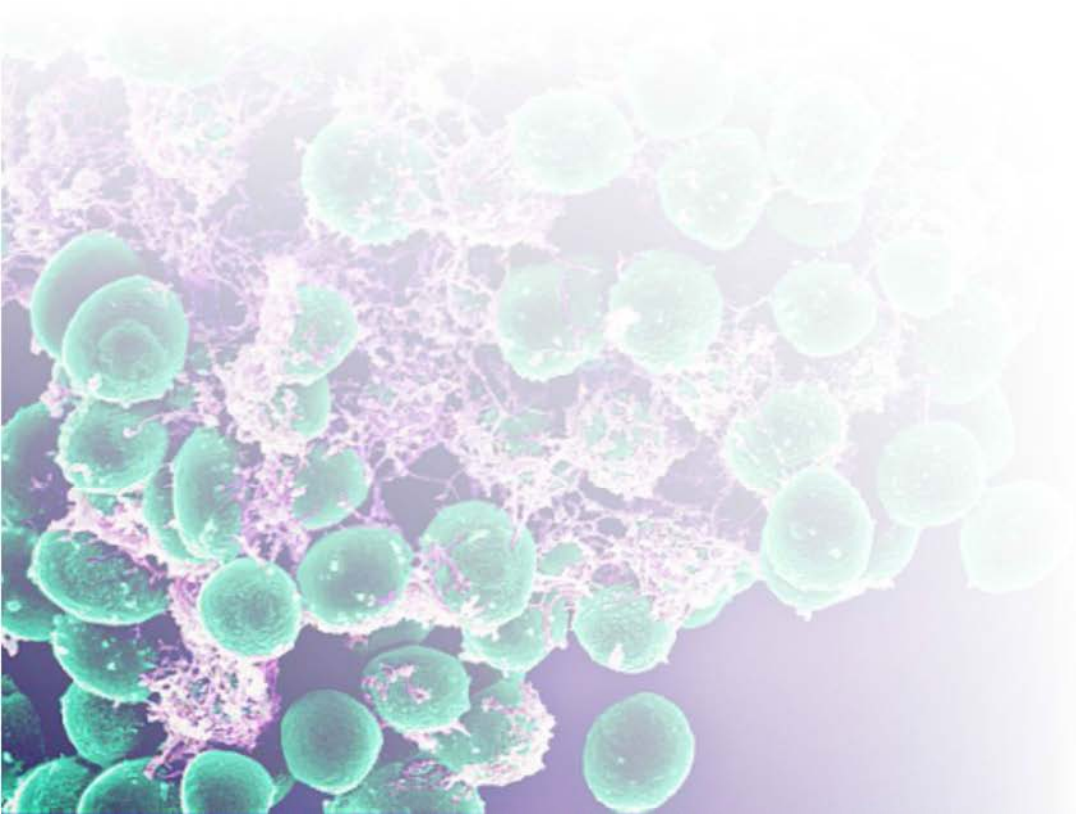
Estudos recentes apontam para elevação da incidência e da gravidade das infecções por *Staphylococcus aureus*. Esse fato é agravado pela ampla disseminação de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) nos hospitais, além de sua recente introdução na comunidade. A colonização nasal de indivíduos assintomáticos é o principal fator responsável pela persistência e disseminação de *S. aureus* nas populações humanas. Assim sendo, inquéritos de carregamento nasal são importantes para estimar a “carga” (*burden*) de *S. aureus* como um todo e de MRSA na comunidade. Além disso, a compreensão da relação bactéria-hospedeiro e dos fatores de virulência envolvidos se faz necessária para o combate às infecções que colocam em risco a vida da população em geral. O presente trabalho teve como objetivo investigar a distribuição de clones de *Staphylococcus aureus* e MRSA na população da área urbana de Botucatu, SP, identificando a prevalência dos determinantes de virulência junto aos fatores de risco associados em isolados obtidos da nasofaringe de indivíduos hígidos do município. Um total de 223 amostras de *S. aureus* isoladas de secreções nasais foi submetido a testes de susceptibilidade antimicrobiana à oxacilina e cefoxitina através da técnica de disco-difusão. O método de E-test foi empregado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em amostras resistentes. Em seguida, foram realizadas reações de PCR para a detecção dos genes *mecA*, genes codificadores de fatores de virulência das enterotoxinas (*sea*, *seb* e *sec*) e toxina associada à síndrome do choque tóxico (*tst*); toxinas esfoliativas A e B (*eta*, *etb*), leucocidina de Panton-Valentine (*lukS-PV* e *lukF-PV*), hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*); e biofilme (*icaA* e *icaD*). A tipagem molecular para a determinação dos *clusters* foi realizada pela técnica de PFGE. Para avaliar os fatores de risco foram utilizadas as análises uni e multivariada de regressão linear. Do total de espécimes analisados, seis foram carregadores do gene *mecA* albergando *SCCmec* IV. Em relação à distribuição dos genes de virulência, obtiveram-se as seguintes taxas percentuais: TSST-1 (*tst*, 28,7%); enterotoxinas (*sea*, 30,9%; *seb*, 14,3%; *sec*, 17,5%); hemolisinas (*hla*, 89,7%; *hld*, 93,3%); biofilme (*icaA*, 0,9%; *icaD*, 95,5%); esfoliatinas (*eta*, 1,3%; *etb*, 1,3%); PVL (*luk-PV*, 2,2%). A análise por PFGE revelou a presença de 11 *clusters* distribuídos pela comunidade (similaridade $\geq 80\%$), com destaque para três deles com maior potencial de virulência uma vez que concentraram maior número de isolados carregando diversos genes de virulência e resistência. Na análise epidemiológica, a prevalência dos genes de virulência investigados mostrou-se menos necessária em indivíduos portadores de diabetes mellitus. Os resultados obtidos apontam a existência de indivíduos saudáveis carregadores nasais de *S. aureus*, apresentando heterogeneidade na distribuição dos determinantes de virulência e evidenciando a presença de clones bem definidos circulantes na comunidade os quais albergam

tanto genes de virulência quanto de resistência à meticilina. Tais resultados podem contribuir para a elucidação da distribuição de *S. aureus* em uma população bem definida.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*, carreamento nasal, MRSA, CA-MRSA, fatores de risco, genes de virulência.



Abstract

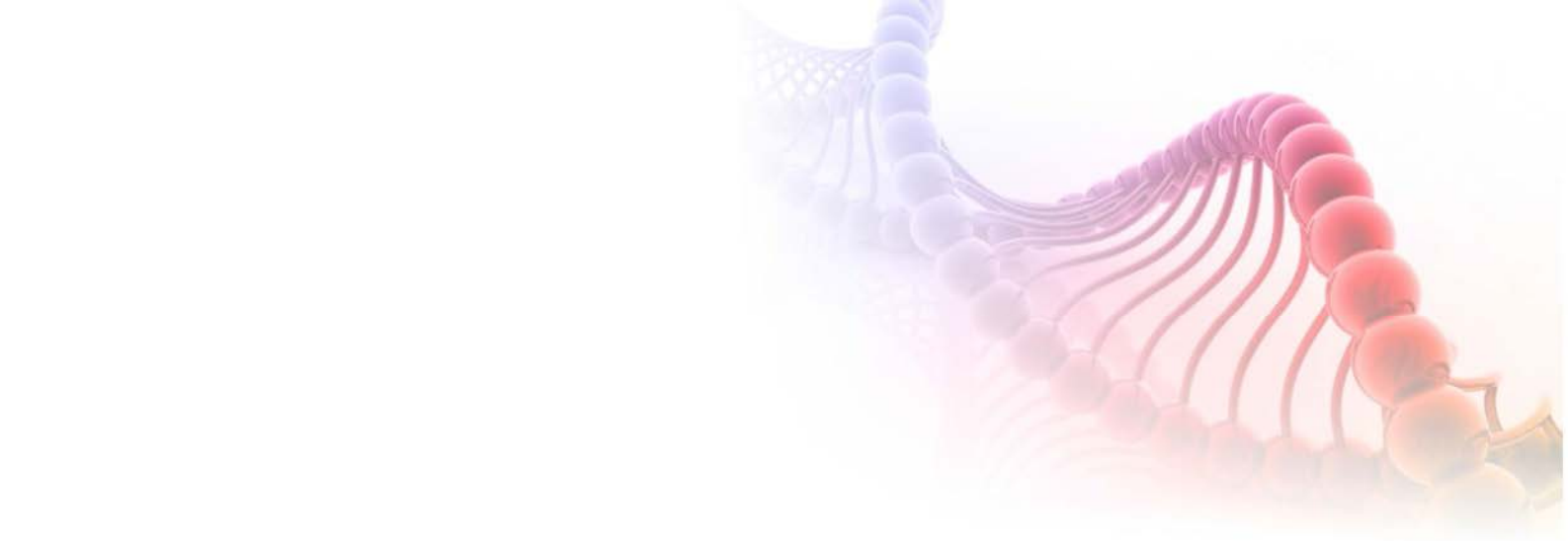


Abstract

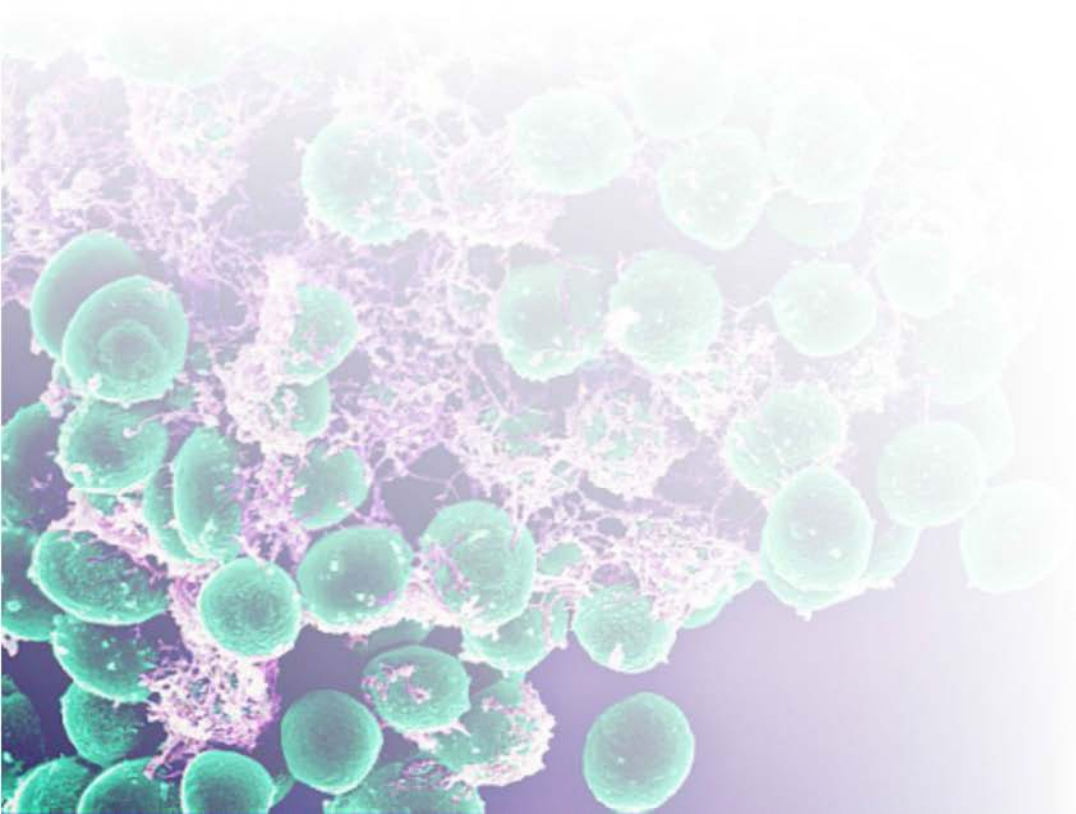
Recent findings show an increase on the incidence and severity of *Staphylococcus aureus* infection. This fact is worsened by the wide dissemination of the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates in hospitals and its recent introduction in the community settings. The nasal colonization in asymptomatic individuals remains the main factor responsible for the persistence and dissemination of *S. aureus* in the human population. Thereby, nasal carriage surveys are an important tool in order to estimate the total *S. aureus* burden and the MRSA in the community. Besides, understanding the bacterial-host relationship and the virulence factors involved is necessary in order to manage the infections that jeopardize the population's health. The present study aims at investigating the clonal distribution of *S. aureus* and MRSA strains in an urban population area in Botucatu, SP, identifying both the prevalence of the virulence determinants together to the associated risk factors in samples obtained from the nasopharynx of healthy individuals from Botucatu. A total of 223 *S. aureus* samples isolated from nasal secretions were submitted to the antimicrobial susceptibility tests through the disk-diffusion method with oxacillin and ceftiofur disks. The E-test method with oxacillin was applied in order to obtain the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) among oxacillin disk resistant samples. Afterwards, PCR (Polymerase Chain Reaction) was carried out for the detection of the *mecA* gene and of the following virulence genes: enterotoxins (*sea*, *seb* and *sec*), toxic shock syndrome toxin (*tst*), exfoliative toxin A and B (*eta*, *etb*), Panton-Valentine Leukocidin (*lukS-PV* and *lukF-PV*), alpha- and delta-hemolysins (*hla* and *hld*), and biofilms (*icaA* and *icaD*). The PFGE molecular typing was employed in order to determine the prevalent clusters. The univariate and multivariate linear regression was carried out so that the risk factors could be evaluated. The results showed that six out of the 223 samples harbored the *mecA* gene in the SCCmec IV. Regarding the distribution of the virulence genes, the rates were: 28.7% for *tst*, enterotoxins (*sea*, 30.9%; *seb*, 14.3%; *sec*, 17.5%); hemolysins (*hla*, 89.7%; *hld*, 93.3%); biofilm (*icaA*, 0.9%; *icaD*, 95.5%); exfoliatins (*eta*, 1.3%; *etb*, 1.3%); PVL (*luk-PV*, 2.2%). The PFGE analysis showed that 11 clusters were spread in the community (similarity $\geq 80\%$), out of which 3 major clusters were highlighted to be considered more virulent due to the high number of isolates that harbored virulence and resistance genes. In the epidemiological analysis, the prevalence of virulence genes investigated proved less necessary in diabetic individuals. Such results obtained indicate that *S. aureus* colonizes the nasopharynx of healthy individuals usually presenting with heterogeneity in the distribution of virulence determinants, as well as demonstrate that the community presents well-

defined clones harboring both virulence genes and methicillin-resistant genes. Such results may contribute to the elucidation of the *S. aureus* distribution in a well-defined population.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, nasal carriage, MRSA, CA-MRSA, risk factors, virulence genes.



1. Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A notável capacidade de *Staphylococcus aureus* desenvolver resistência antimicrobiana, somada à emergência de cepas altamente virulentas, instituiu esse patógeno como uma das principais causas de infecção bacteriana em humanos.¹

A extensa disseminação de cepas resistentes, alcançando agora o ambiente comunitário, tem culminado em ameaça global¹, de modo que essa questão tem gerado preocupação não somente por parte dos serviços de saúde como também tem motivado pesquisas visando à ciência dos perfis epidemiológico e patogênico de *S. aureus* atrelados às suas peculiaridades, direcionando, assim, estratégias a fim de nortear a contenção do problema.

1.2 *Staphylococcus aureus*: epidemiologia, patogênese, resistência antimicrobiana e relevância clínica.

Staphylococcus aureus é um comensal humano versátil reconhecido como um dos principais agentes virulentos, sendo capaz de causar um amplo espectro de infecções que se caracterizam pela variedade de apresentações clínicas, incluindo desde quadros localizados até doenças sistêmicas de alta letalidade.^{2,3,4} Embora seja considerado o patógeno mais importante dentro do gênero, cerca de 15 das 47 espécies conhecidas de *Staphylococcus* são potencialmente patogênicas em humanos.⁵ Destaca-se globalmente como agente etiológico de relevantes taxas de morbidade e mortalidade tanto no âmbito hospitalar quanto no comunitário.⁴

Dentre as principais síndromes infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus*, podemos elencar 3 tipos, descritos no quadro 1 abaixo:

Quadro 1. Principais síndromes infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus*.⁶

Tipos	Síndromes
Tipo I – Lesões superficiais	Infecções de pele e partes moles
Tipo II – Toxinoses	Intoxicação alimentar
	Síndrome da pele escaldada
	Síndrome do choque tóxico
Tipo III – Condições sistêmicas potencialmente fatais	Endocardites, osteomielites
	Abscesso cerebral
	Pneumonias
	Meningites e bacteremias
	Infecções de sítio cirúrgico

Esse microrganismo diferencia-se dos demais membros do gênero pela produção de coagulase, que é facilmente detectada em testes rotineiros. Seus reservatórios naturais são o homem e outros animais de sangue quente. Apesar disso, *S. aureus* são capazes de sobreviver em superfícies inanimadas por um longo período de tempo.^{7,8}

Enquanto membro persistente da microbiota humana, esse potente patógeno encontra-se em diferentes sítios anatômicos, incluindo a nasofaringe. É capaz de se proliferar em qualquer parte do corpo humano e ser transmitido a outras pessoas suscetíveis ou animais, podendo, em certas circunstâncias, agravar quadros de infecção no próprio hospedeiro.^{4,2}

A nasofaringe é considerada um nicho ecológico primário de colonização desse microrganismo. Desse modo, entende-se por colonização o processo dinâmico em que a bactéria deve se anexar às superfícies do hospedeiro, superando os componentes imunes e competindo com outros microrganismos comensais. O fenômeno da colonização, ou seja, o carreamento desse patógeno, sem sinais clínicos ou interação imunológica é uma propriedade biológica fundamental desse microrganismo, que tem sido identificada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções por *S. aureus* tanto na comunidade como nos hospitais.^{6,8,9,10,11}

A colonização por *S. aureus* tem início pouco após o nascimento e recorre diversas vezes ao longo da vida.¹² Aproximadamente um de cada três indivíduos sadios carregam *S. aureus* assintomaticamente em suas narinas, sem qualquer doença associada.¹³ Logo, estima-se que 20% dos seres humanos carreguem persistentemente essa bactéria na mucosa nasal e outros 30% o carregam de forma intermitente.¹⁴

Acredita-se que carreadores de *S. aureus* apresentem maiores riscos de adquirir infecção, e presume-se que os mesmos sejam uma importante fonte de disseminação da bactéria entre os indivíduos.⁹ Estudos revelam que indivíduos colonizados com uma grande carga bacteriana apresentam risco seis vezes maior de desenvolver infecção estafilocócica, em comparação a indivíduos não-carreadores ou com baixa carga bacteriana.¹⁵

É necessário acrescentar que, embora a nasofaringe seja o local mais consistente de colonização por *S. aureus*, sendo indicada como o ambiente mais apropriado para *screening* com *swabs*, outros sítios - extra-nasais - também podem ser colonizados, como garganta, axilas, períneo e trato gastrointestinal.^{3, 11, 14}

A patogênese de *S. aureus* é complexa e depende de diversos fatores associados à doença clínica, os quais incluem a virulência do patógeno, resistência antimicrobiana e susceptibilidade do hospedeiro.^{13,15} A multiplicidade de infecções causadas por *S. aureus* está relacionada a um arsenal de fatores de virulência que lhe garantem sucesso como colonizantes e agentes de infecção, permitindo a adesão desse microrganismo à superfície das células, invasão ou evasão

do sistema imune, causando assim efeitos tóxicos nocivos ao hospedeiro. Esses fatores incluem a expressão de inúmeras toxinas distintas, proteínas de adesão da parede celular, enzimas extracelulares e exotoxinas.^{15,16}

Estudiosos afirmam que o primeiro passo para a infecção por *Staphylococcus* é o processo de adesão a superfícies,¹⁷ o qual se inicia por meio da colonização mediada por diversas adesinas. Uma das principais classes de adesinas compreende as proteínas covalentemente ancoradas no peptídeoglicano que se ligam ao plasma ou a componentes da matriz extracelular, sendo denominadas coletivamente de componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMS). Essas moléculas reconhecem componentes importantes do plasma, como fibrinogênio, fibronectina e colágeno. Fazem parte dos MSCRAMMS a proteína A (SpA), as proteínas ligadoras da fibronectina (FnbpA e FnbpB), a proteína ligadora do colágeno e o fator *clumping* (proteínas A e B).⁶

Junto aos fatores supracitados, a formação de biofilme representa um importante fenótipo de virulência no estabelecimento de infecções crônicas.¹⁷ Biofilmes são comunidades estruturadas de células bacterianas incorporadas por uma matriz polimérica auto-produzida capazes de se aderir tanto a superfícies vivas quanto inertes.¹⁷ Essas estruturas acabam dificultando o tratamento de infecções por conferir à bactéria uma resistência à ação dos antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro.^{17,18} O principal componente do biofilme é a adesina intracelular polissacarídica (PIA), que é composta por um polímero beta- 1,6-N-acetilglicosamina sintetizado por uma enzima codificada pelo *operon ica* localizado no cromossomo da bactéria. Esse *operon* inclui um elemento regulador de quatro genes (A, B, C e D).¹⁹

Praticamente todas as cepas de *S. aureus* secretam um grupo de exoproteínas incluindo as exotoxinas e enzimas como as nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e collagenases.⁶ A principal função dessas proteínas parece estar ligada à conversão do tecido local do hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. Existem as exoproteínas com atividade citolítica, dentre as quais destacamos as hemolisinas alfa, beta e delta e a Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)⁶, sendo esta última classificada como um biocomponente de citolisina, capaz de formar poros nos leucócitos, e associada a quadros de extensa necrose tecidual, acarretando infecções de pele graves e pneumonias necrotizantes.⁶ A PVL é encontrada principalmente em isolados de *S. aureus* resistentes à metilicina adquiridos na comunidade, fazendo-se presente também em amostras sensíveis.^{6,15,21} Já as hemolisinas apresentam atividade citotóxica para os eritrócitos e leucócitos.⁶

Adicionalmente as exotoxinas já descritas incluem-se a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), que compõem uma classe de mais de 20

tipos sorologicamente distintos²² incluindo as enterotoxinas like (SE-like), e as toxinas esfoliativas (ETA e ETB).^{6,20} Dentre essas, a TSST-1 e as enterotoxinas pertencem a um grupo de toxinas conhecidas como superantigênicas, caracterizadas especialmente por estimularem a proliferação de linfócitos T.

A toxina 1 da síndrome do choque tóxico é um superantígeno associado a um quadro clínico de febre alta, exantema e extravasamento de líquido em vasos capilares, resultando em hipotensão e edema, o que caracteriza a Síndrome do Choque Tóxico causada por *S. aureus* colonizando tecidos distantes.^{6, 21} As enterotoxinas ingeridas através de alimentos associam-se a quadros de intoxicação alimentar caracterizados por diarreias e vômitos.²⁰ As esfoliatinas (ETA, ETB, ETD) determinam a clivagem de camadas profundas do epitélio, causando quadros de eritema e descamação disseminados, sendo possível afirmar que estão diretamente envolvidas com a Síndrome da Pele Escaldada ou lesões bolhosas (Impetigo bolhoso).^{20, 21}

A maioria dos fenótipos de virulência é coordenada pelo sistema *agr* (gene regulador acessório). O *locus agr* é um agrupamento de genes com atividade *quorum sensing*, mecanismo pelo qual a bactéria consegue “perceber” a densidade celular do meio em que se encontra através da comunicação entre as células presentes, permitindo uma reação fenotípica de acordo com a fase de crescimento em que a cultura se encontra. O *quorum sensing* é importante em *Staphylococcus* porque certas proteínas, tais como os fatores de virulência, só devem ser expressas em determinada fase de crescimento.²³ A atividade inibitória dos grupos *agr* representa um método de interferência bacteriana que afeta a expressão dos genes de virulência.²⁴ É possível que alguns clones de *S. aureus* sejam mais propensos que outros para determinar uma doença invasiva, o que pode ser devido a esses diversos mecanismos ligados aos fatores de virulência existentes.²⁵

Além da expressão dos fenótipos de virulência, a alta patogenicidade de *Staphylococcus aureus* se deve à ampla resistência antimicrobiana entre os isolados, o que tem dificultado consideravelmente o tratamento das infecções em âmbito mundial.²⁶ De fato, desde o início da “era dos antibióticos”, essa espécie provou-se capaz de desenvolver resistência à praticamente todas as classes de antimicrobianos disponíveis na prática clínica.²⁷

Em meados da década de 1940, logo após a introdução da penicilina na prática clínica, foram relatadas cepas de *S. aureus* resistentes, seguidas por uma pandemia de resistência à referida droga. Prevalente inicialmente apenas nos hospitais, hoje a resistência à penicilina está presente em mais de 90% dos isolados da comunidade. Essas estirpes interrompem a ação do anel β -lactâmico da penicilina por meio da produção de uma penicilinase mediada por plasmídeos.¹⁵

No final da década de 1950, a meticilina foi introduzida como um protótipo de uma classe de penicilinas resistentes à inativação por penicilinases. A essa classe pertence também a oxacilina²⁸, que embora apresentem grande potência antiestafilocócica, tiveram seu uso clínico limitado pela emergência da resistência. *S. aureus* resistentes à meticilina conhecidos pela sigla MRSA, (do inglês *methicillin-resistant S. aureus*), surgiram inicialmente na Europa na década de 1960, após a introdução da meticilina na prática clínica, e emergiram como uma séria ameaça à saúde pública mundial.^{28,29}

Ao longo do tempo, sofreram grande disseminação em hospitais e em outros serviços de saúde. Já na década de 1990, a maioria dos isolados de origem hospitalar eram MRSA.³⁰ Um fenômeno mais preocupante se observou na década seguinte: a identificação de MRSA em pessoas sem história de exposição a ambiente hospitalar.³¹ Nesse cenário, delinearam-se duas importantes classes de microrganismos problema, identificadas como HA-MRSA (*Hospital-acquired* [adquiridos no hospital]-MRSA) e CA-MRSA (*Community-acquired* [adquiridos na comunidade]-MRSA).³²

A distinção entre cepas de HA-MRSA e CA-MRSA foi possível até o surgimento do primeiro relato de CA-MRSA. Consideravam-se infecções por CA-MRSA aquelas ocorridas em indivíduos oriundos da comunidade que não apresentassem fatores de risco de exposição ao ambiente hospitalar, exibindo um perfil de sensibilidade distinto dos HA-MRSA que tivessem infectado pacientes hospitalizados com riscos específicos para aquisição de infecção. Porém, nos últimos cinco anos, um fato interessante é a infiltração do CA-MRSA no ambiente hospitalar ocupando lugar dos HA-MRSA, principalmente em países em que a prevalência do CA-MRSA é alta.¹⁶

Ainda que na atualidade seja difícil a distinção entre essas cepas em termos de apresentação clínica, sensibilidade antimicrobiana e caracterização molecular, é possível identificar características distintas (Quadro 2) dos CA-MRSA quando comparados aos HA-MRSA,³² descritas no quadro a seguir.

Quadro 2. Diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA

	HA-MRSA	CA-MRSA
Pacientes típicos	Pacientes idosos muitas vezes debilitados Pacientes com doenças crônicas (ex. diabéticos com úlceras de pele)	Pessoas previamente saudáveis, frequentemente jovens Indivíduos envolvidos em atividades de contato próximo (ex. equipes esportivas ou serviços militares, especialmente aquelas que resultam em abrasões de pele)
Infecções clínicas	Pacientes em Unidades de Terapia Intensiva Pacientes renais associados a dispositivos de longa permanência Infecções de ferida Doenças respiratórias e do trato urinário	Tendem a ser mais agressivas na pele e tecidos moles Pneumonias necrotizantes, choque séptico e bacteremia nos casos mais graves
Fatores de risco	Dispositivos de longa permanência, hospitalização prolongada e uso de antibióticos a longo prazo	Contato físico próximo, baixas condições de higiene, instalações sanitárias compartilhadas, indivíduos que vivem em locais superlotados, (ex. recrutas militares e prisioneiros)
Transmissão	Hospitalar Pouco difundida entre os contatos intradomiciliares	Predominantemente adquirida na comunidade Dissemina-se no seio das famílias e equipes esportivas
Susceptibilidade antibiótica	Clones típicos da Inglaterra (EMRSA 15 e 16), resistentes à eritromicina, ciprofloxacina, aminoglicosídeos, clindamicina, tetraciclina, rifampicina e ácido fusídico	Geralmente mais susceptíveis aos agentes não-betalactâmicos, incluindo a ciprofloxacina
Características moleculares	SCCmec tipos I, II ou III (exceto o EMRSA 15 da Inglaterra que tem o SCCmec tipo IV) PVL é menos comum	Principalmente o SCCmec tipo IV ou V PVL é mais comum

Fonte: Cooke et al³²

A resistência à meticilina é mediada por uma alteração no receptor celular dos beta-lactâmicos, isto é, a proteína ligadora de penicilina (PBP2a). Essa proteína modificada PBP2a, tem baixa afinidade com a penicilina e é codificada pelo gene *mecA*, conferindo ampla resistência contra todos os antibióticos pertencentes a classe dos β -lactâmicos.¹⁵

O gene *mecA* está localizado em uma “ilha genômica” de resistência, conhecida como cassete cromossômico estafilocócito *mec* (SCCmec, *Staphylococical chromosome cassette*

mec).³³ Os elementos do *SCCmec* são divididos em diferentes tipos com base nas diferenças entre os nucleotídeos em dois componentes essenciais: complexo *ccr* (recombinase cassete cromossômico), representado pelos genes *ccr*, e complexo de genes *mec*.¹⁶ Segundo o IWG-SCC (*International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements*), existem onze tipos de *SCCmec* em cepas de *S. aureus* descritos até o momento os quais diferem em tamanho e composição dos elementos de resistência antimicrobiana.^{15,34}

Geralmente, cepas HA-MRSA albergam o *SCCmec* tipos I, II ou III, que são maiores e incluem diversos determinantes de resistência, o que justifica o fato de que os isolados hospitalares de MRSA costumam apresentar resistência simultânea a várias classes de antimicrobianos. Por outro lado, as cepas de MRSA adquiridos na comunidade carregam um *SCCmec* menor tipos IV, V, VI, apresentando menos elementos de resistência, ou seja, frequentemente mais susceptíveis a macrolídeos, quinolonas, tetraciclina, trimetoprim, sulfametoxazol, e lincosamidas. No entanto, estão associados - em alguns casos - à presença de genes codificadores da PVL e de outras exotoxinas que conferem aos CA-MRSA maior virulência.³⁵ Essas cepas estão associadas à infecções graves de pele e pneumonias necrotizantes.³⁶

Apesar de as opções terapêuticas para MRSA (e em particular HA-MRSA) serem restritas, seus potenciais agentes terapêuticos incluem a clindamicina, trimetoprim – sulfametoxazol, linezolida, daptomicina, tetraciclina como (doxiciclina e minociclina), e os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina).¹

No entanto, isolados com suscetibilidade intermediária aos glicopeptídeos foram descritos desde a década de 1990.³⁷ A recente emergência de *S. aureus* com resistência completa a vancomicina devido à aquisição de genes *vanA* a partir de enterococos resistentes à vancomicina torna-se ainda mais preocupante. Felizmente, esse fenótipo tem distribuição restrita, com apenas doze casos descritos nos Estados Unidos.^{38,39} Novas drogas com atividade antiestafilocócica (como a linezolida e a daptomicina) são uma opção para *S. aureus* resistente a glicopeptídeos. No entanto, a resistência parcial ou completa a esses agentes também já foi detectada.^{40, 41}

1.3 Estudos de base populacional sobre colonização/infecção por *Staphylococcus aureus*.

A contínua emergência de isolados multirresistentes de *S. aureus* tem instigado uma série de estudos visando à quantificação da carga (*burden*) de colonização e infecções estafilocócicas em meio à população. Uma dessas iniciativas, capitaneada pelos Centros para Prevenção e

Controle de Doenças (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*), procurou descrever a incidência e a distribuição de doenças invasivas por MRSA nos Estados Unidos.⁴⁰ Uma vigilância ativa dessas infecções foi realizada em nove cidades norte-americanas durante os anos de 2004 e 2005. Foram identificadas 8.987 infecções, das quais 85,0% haviam sido adquiridas em hospitais e outros serviços de saúde, enquanto 13,7% eram de origem comunitária.⁴⁰

Outro trabalho de cunho nacional também realizado nos EUA mostrou que a prevalência de colonização/infecção por MRSA em pacientes internados em unidades de saúde aumentou nos últimos anos. Foram reportadas 4.476 infecções/colonizações por MRSA em 67.412 pacientes, ou seja 25,3 infecções e 41,1 colonizações a cada 1.000 pacientes internados.¹⁰

Conforme registros atuais do Reino Unido, houve um aumento nas taxas de admissão hospitalar com episódios de infecções adquiridas na comunidade tendo como principal agente causador o *S. aureus*.⁴¹ Utilizando dados secundários do sistema de saúde britânico realizou-se uma estimativa do comportamento epidemiológico das infecções estafilocócicas durante as décadas de 1990 e 2000.⁴² Os autores apresentaram achados alarmantes: um aumento de cinco vezes nas hospitalizações por sepse, pneumonia estafilocócica, síndrome da pele escaldada e impetigo; aumento de três vezes das internações por abscessos e celulites; e aumento de 150% nas admissões por infecções de ossos e articulações. Nas unidades básicas de saúde, a prescrição de antibióticos antiesfílicos cresceu de 1,8 a 2,5 vezes entre 1991 e 2006.⁴²

Outros estudos quantificaram o carregamento de *S. aureus* no âmbito populacional. Nos anos de 2001 e 2002 incluiu-se no estudo NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) a coleta de amostras de nasofaringe. O estudo NHANES é realizado nacionalmente e corresponde a uma amostra representativa da população civil não institucionalizada dos Estados Unidos. A triagem para carregamento nasal de *S. aureus* foi realizada em todos os indivíduos com idade acima de um ano participantes do estudo. Os resultados foram descritos e analisados em três publicações.^{43, 44, 45}

Em 9.622 participantes, a prevalência de colonização por *S. aureus* foi de 32,4%. A colonização por MRSA estava presente em 0,8%. Fatores significativamente associados ao carregamento de *S. aureus* foram: idade menor que 6 anos, adultos que não haviam completado o ensino médio, e diagnóstico de asma. O carregamento de MRSA estava associado à idade maior que 65 anos, sexo feminino, diabetes e estadia recente em casas de repouso, mas não em hospitais. Um acompanhamento desse estudo em anos posteriores demonstrou que a prevalência do carregamento de *S. aureus* sofreu redução estatisticamente significativa, caindo para 28,6% em 2003-2004. Nesse mesmo período, porém, taxas de carregamento de MRSA quase duplicaram (de 0,8% para 1,5%, $p < 0.05$).⁴⁶ Os dados do NHANES são bastante abrangentes, embora seu significado seja limitado pelo longo período decorrido desde o estudo.

Outras publicações apresentam estimativas populacionais de carreamento de *S. aureus* ou MRSA em espaços mais restritos. Furuya et al.⁴⁷ investigaram o carreamento nasal de MRSA em 739 habitantes de Manhattan, identificando prevalência de 0,3%.⁴⁷ Outro estudo, realizado em Birmingham (Inglaterra), investigou 274 pacientes, identificando taxas de carreamento de 33,0% para *S. aureus* e 1,5% para MRSA.⁴⁸ Um estudo recente realizado na Espanha investigou o carreamento nasal de *S. aureus* em 278 sujeitos saudáveis determinando a prevalência de *S. aureus* sensíveis a meticilina – MSSA, MRSA e alguns traços de virulência. Dados revelaram 19,1% (53) de colonização por *S. aureus*, onde 0,4% correspondiam a cepas de MRSA e os 52 isolados restantes MSSA.⁴⁹

Em Taiwan, um estudo realizado com 3200 crianças revelou 25,8% de *S. aureus* e 11,6% de MRSA, sendo também pesquisada a prevalência de algumas exotoxinas estafilocócicas.¹¹ Nesse mesmo país, foi realizada uma triagem para carreamento nasal de MRSA em 1.838 pessoas da comunidade e 393 indivíduos com contato com serviços de saúde.⁵⁰ No primeiro grupo, a prevalência de colonização foi de 3,6% e no segundo, os resultados foram: 5,0% (profissionais da saúde), 5,8% (pacientes em enfermaria com doenças agudas), 5,9% (pacientes de hemodiálise) e 11,0% (indivíduos em instituições de longa permanência).⁵⁰

1.4 Cenário nacional

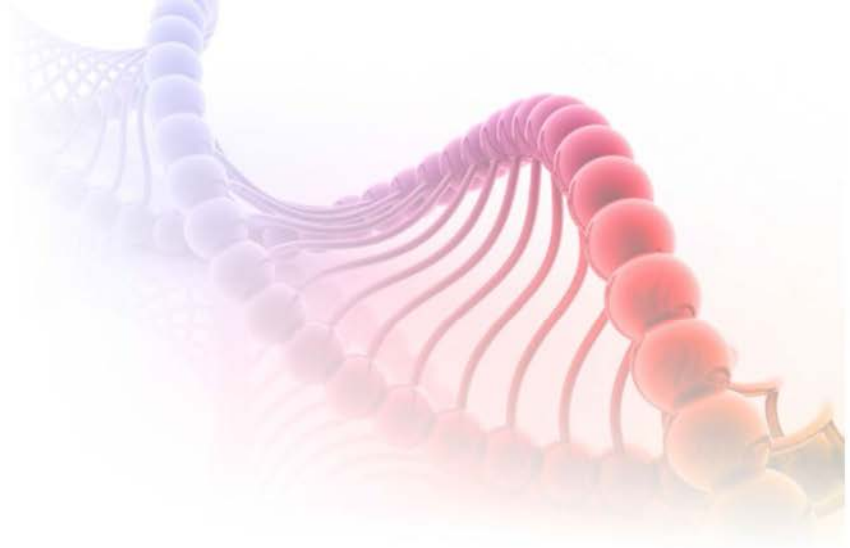
Embora não existam estimativas seguras, é razoável inferir que as infecções estafilocócicas sejam bastante incidentes na população brasileira. Em um relato do programa SENTRY, *S. aureus* foi o agente mais freqüentemente isolado em espécimes clínicos de hospitais brasileiros. Ele manteve a liderança entre os agentes de infecções de tegumento e corrente sanguínea e ficou em segundo lugar entre os agentes de pneumonias.⁵¹ Dados mais recentes confirmaram esse padrão e identificaram resistência à meticilina em 31,0% dos isolados.⁵⁰

No ano de 2010, no sul do país foi avaliada a prevalência e aquisição de MRSA entre pacientes submetidos a atendimento em um hospital de nível terciário. De 297 pacientes adultos e 176 pediátricos, a prevalência de MRSA na admissão foi de 6,1% entre a população adulta e 2,3% para crianças.⁵² Por outro lado, o sistema de vigilância de infecções hospitalares do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo reportou o isolamento de *S. aureus* em 16,3% das hemoculturas colhidas em Unidades de Terapia Intensiva. Ao todo, 58,2% dos isolados eram MRSA.⁵³

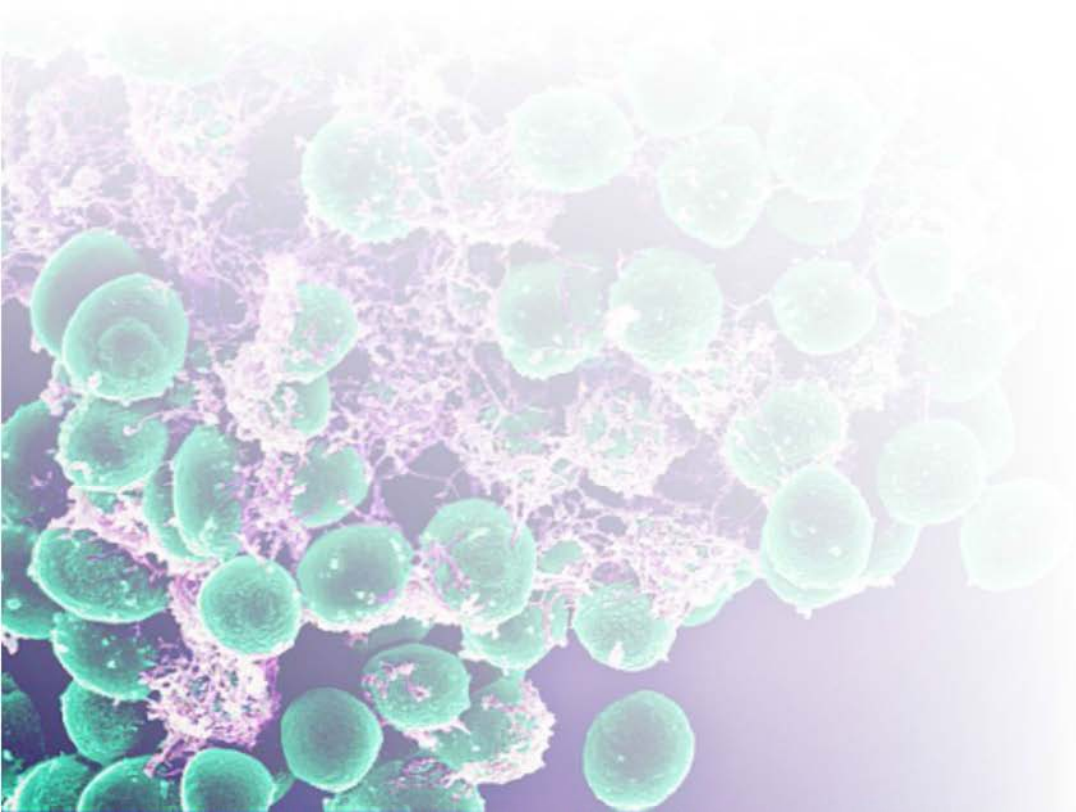
A ampla disseminação de MRSA em hospitais do Brasil é bem documentada e um clone endêmico brasileiro portador de *SCCmec* III foi extensamente caracterizado.^{54,55} Embora o MRSA seja endêmico nos hospitais, ainda são poucos os relatos sobre colonização por CA-MRSA no Brasil.⁵² Nascimento-Carvalho et al⁵⁶ relatam a identificação de 125 infecções por MRSA possivelmente adquiridas na comunidade, mas não realizaram a caracterização molecular desses isolados.⁵⁶

Recentemente, em estudo realizado por Scribel et al⁵⁷, indivíduos submetidos a atendimento em Unidades Básicas de Saúde no Brasil foram testados para carreamento nasal de *S. aureus* (200) e MRSA (136) cujas taxas obtidas foram de 11,5% para *S. aureus*, sendo que nenhum isolado resistente foi encontrado. Neste mesmo panorama, o transporte de *S. aureus* e MRSA foi pesquisado em crianças de 62 centros de cuidados diários. Do total de 1192 crianças avaliadas, 31,1% eram portadoras de *S. aureus* contra 1,2% portadoras de MRSA.⁵⁸

Entretanto, relatos de casos isolados⁵⁹ e estudos em bancos de cepas^{60,61} têm documentado a disseminação de isolados de MRSA carreando *SCCmec* IV em centros urbanos do país. Fato interessante é que, em muitos casos, as infecções por MRSA de portadores de *SCCmec* IV tinham sido adquiridas em serviços de saúde.^{60,62} Assim, o entendimento da epidemiologia do carreamento nasal por *S. aureus* pode auxiliar na descoberta de soluções para a gestão e o controle das infecções causadas por esse microrganismo, especialmente MRSA.



2. Justificativa

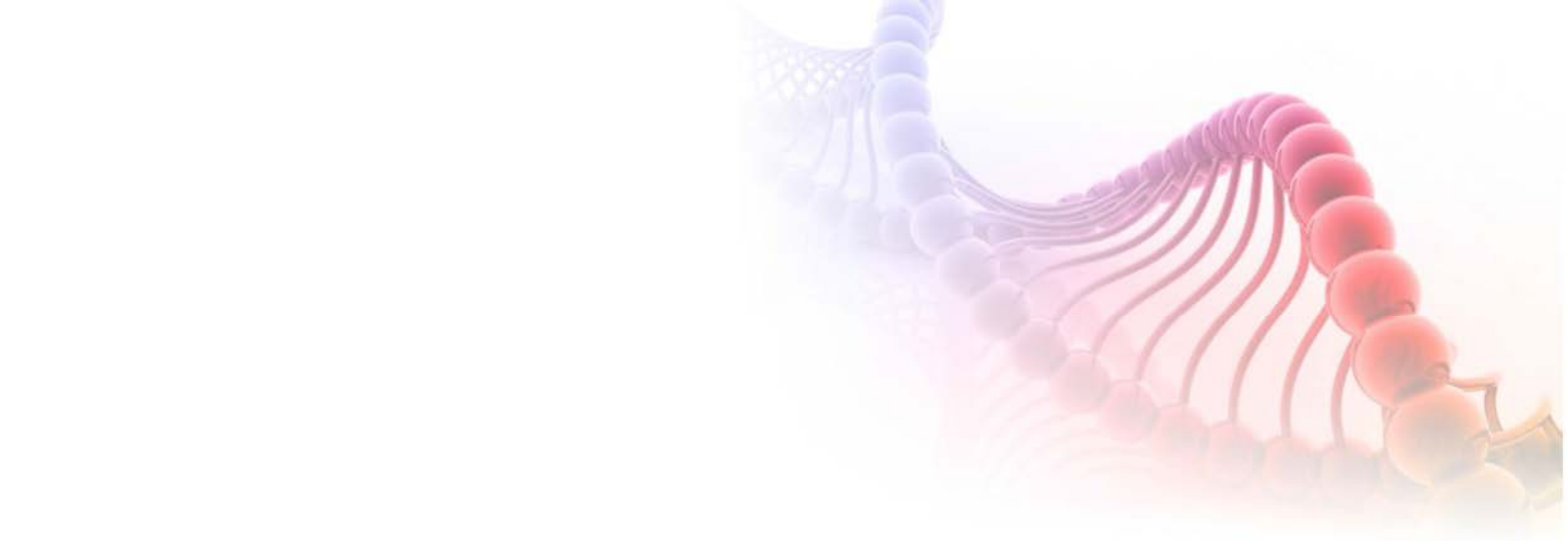


2 JUSTIFICATIVA

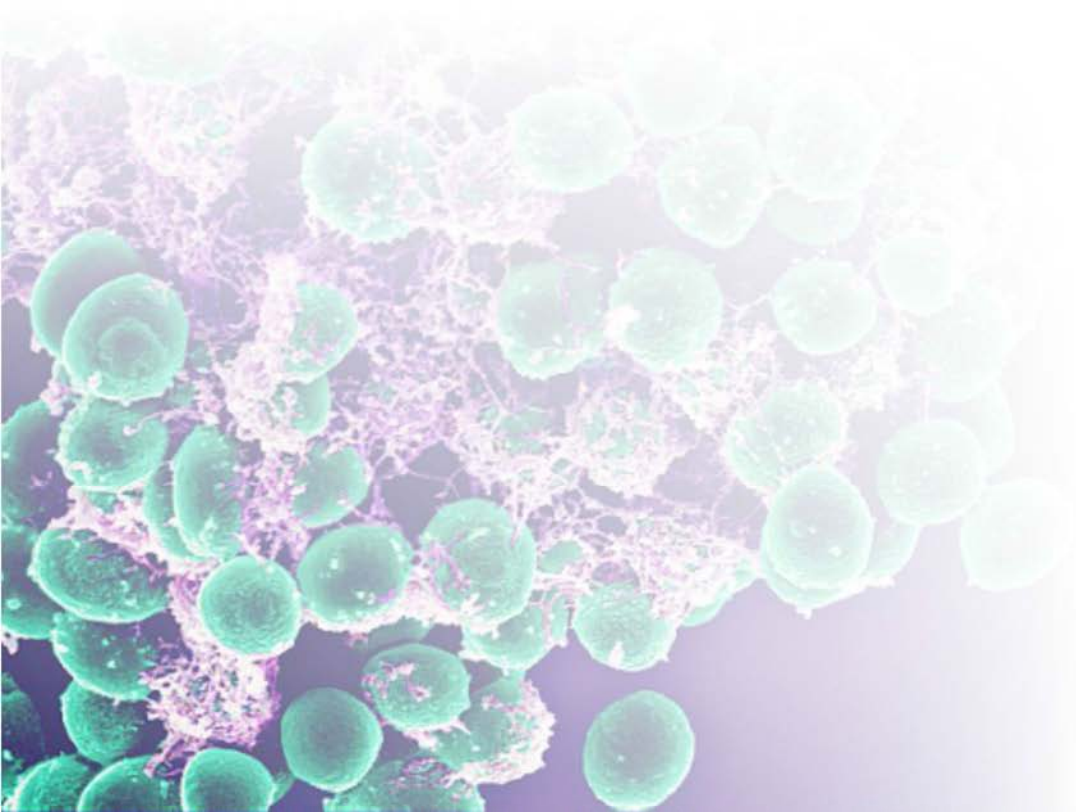
Os argumentos apresentados acima demonstram a necessidade e a importância da realização de estudos de base populacional em uma busca pela compreensão da relação bactéria-hospedeiro e dos fatores de virulência envolvidos para o combate às infecções que colocam em risco a integridade da saúde da população. Tais estudos podem fornecer dados relevantes para a compreensão da epidemiologia da colonização/infecção por *S. aureus* além de apoio para a abordagem clínica de pacientes.

Entre as informações relevantes que podem ser obtidas de um estudo com esse delineamento, encontram-se: a estimativa da prevalência de colonização por *S. aureus* e CA-MRSA na comunidade, a análise da distribuição dos fenótipos de virulência em isolados comunitários e a identificação dos fatores de risco associados e do perfil clonal dos isolados.

Esse estudo propõe uma abordagem da população de Botucatu, município de 122.659 habitantes (IBGE 2010)⁶³ que, apesar de seu pequeno porte, alberga a maior instituição pública vinculada ao Sistema Único de Saúde (SUS) na região, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina. A instituição apresenta 467 leitos, sendo 52 de UTI. Estima-se que 1,5 milhões de pessoas oriundas de 68 municípios sejam atendidas nesse hospital, onde o MRSA é endêmico (CCIRAS – HC/FBM)⁶⁴. Assim sendo, acreditamos que o município seja um espaço privilegiado não só para estudar a prevalência de colonização de *S. aureus* como um todo e CA-MRSA, mas também para identificar outros fenômenos, como determinantes de virulência e distribuição de *clusters* de *S. aureus* e MRSA na comunidade.⁵⁰ Acrescente-se a isso o fato de que o município foi participante do inquérito multicêntrico de saúde do Estado de São Paulo,^{54,65} possibilitando assim o acesso dos pesquisadores a uma amostra populacional já estratificada por setor censitário, gênero, idade e classe social.



3. Objetivos



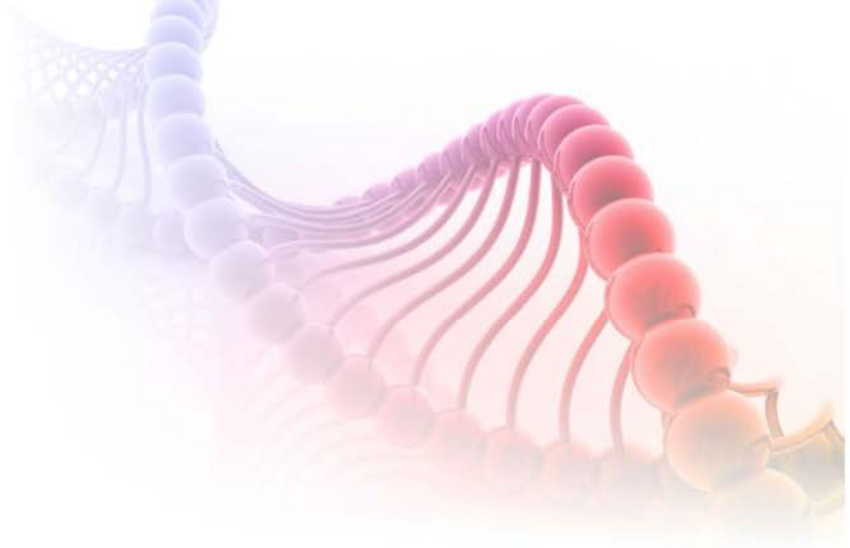
3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

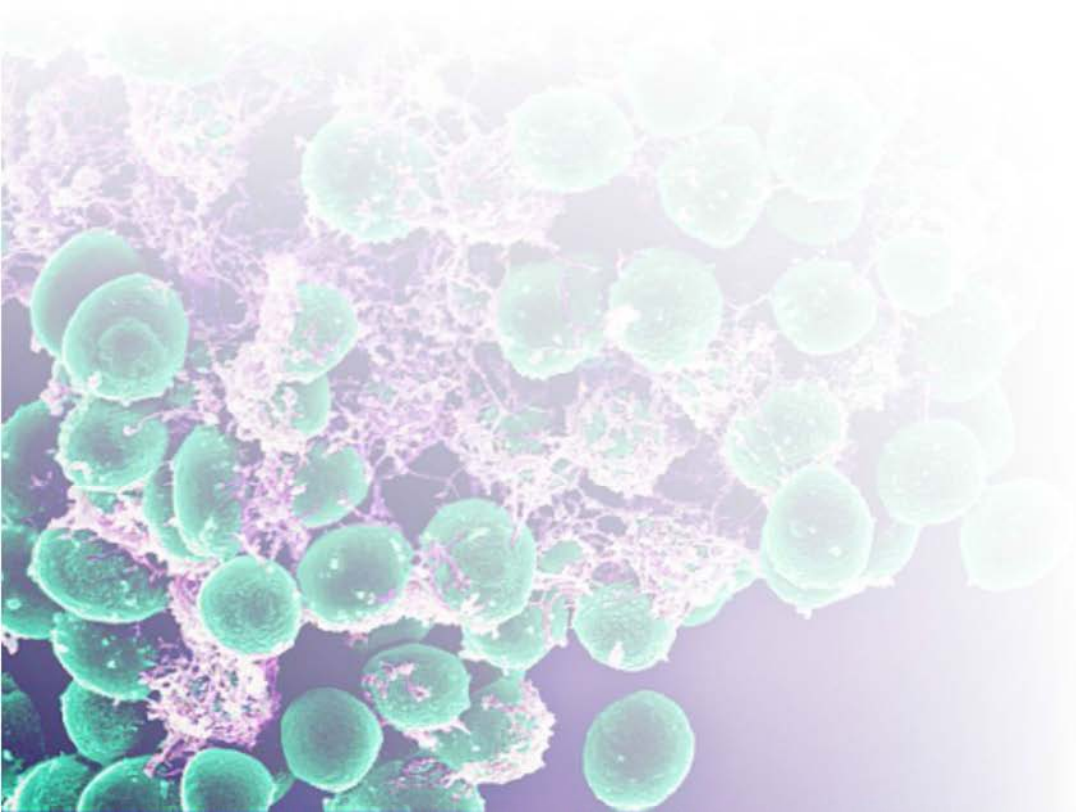
- Investigar a distribuição de clones de *S. aureus* e MRSA na população de área urbana de Botucatu, SP, identificando a prevalência dos determinantes de virulência e fatores de risco associados a sua aquisição em isolados obtidos da nasofaringe na população estudada.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar *clusters* domiciliares de *S. aureus* e MRSA.
- Determinar o tipo de SCCmec das amostras de MRSA isoladas.
- Determinar genotipicamente os fatores de virulência para produção de leucocidina Pantón Valentine, hemolisinas alfa e delta, enterotoxinas, toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), biofilme e toxinas esfoliativas.



4. Metodologia



4. METODOLOGIA

4.1 Local do estudo

O município de Botucatu localiza-se a 22°53'09" de latitude sul, 48°26'42" de longitude oeste, e a 804 metros de altitude, distanciando-se 235 km da capital São Paulo. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimou uma população de 122.659 habitantes no censo de 2010. A figura 1 apresenta um mapa do município.

Figura 1. Mapa do município de Botucatu.



Mais de 95% da população do município reside em área urbana. No inquérito multicêntrico de saúde do estado de São Paulo⁶⁵, 25% da população entrevistada se referiu a algum problema de saúde nos últimos 15 dias, e 92% destes habitantes havia procurado assistência médica. Em quase 40% dos casos, tal assistência foi procurada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Universidade Estadual Paulista – UNESP).

O presente estudo foi realizado na área urbana do município de Botucatu, previamente mapeada durante o inquérito de saúde.

4.2 População do estudo

Foram incluídas no estudo pessoas com mais de um ano de idade residentes na área urbana de Botucatu e que consentiram em participar voluntariamente da pesquisa.

A amostra populacional foi estratificada por idade, gênero e local de residência. Para o cálculo do tamanho amostral, foram utilizados os seguintes parâmetros:

- População do município: 122.659 habitantes.
- Prevalência estimada do carregamento de *S. aureus* (segundo NHANES^{43, 44, 45}): 32.4%.
- Margem de erro: 5%.
- Efeito de desenho do estudo: 2.0.
- Aplicação da fórmula: $n = [DEFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p)]$ ⁶⁶

Com esses parâmetros, a população total estimada para o estudo, com nível de confiança de 95%, foi de 672 sujeitos. Por razões operacionais, esse número foi ampliado para 686.

A distribuição por faixas etárias e gênero seguiu os padrões do inquérito multicêntrico de saúde do Estado de São Paulo.⁶⁵ A exemplo do que foi realizado neste inquérito e também pelo NHANES,^{43, 44, 45} não foram incluídos menores de um ano de idade. Em uma segunda etapa do estudo, foram colhidos exames dos contactantes familiares dos indivíduos cujo carregamento de MRSA foi identificado.

4.3 Operacionalização

A amostragem foi realizada com conglomerados (domicílios e residências) na zona urbana do Município de Botucatu. Foram utilizados os mapas dos setores censitários usados na Contagem Populacional do IBGE em 2007 para o cadastro ordenado dos domicílios residenciais, respeitando as quadras sorteadas e seu sentido de percurso, isto é, sentido horário de acordo com as faces identificadas dos quarteirões.

Para a operacionalização deste projeto, preparou-se uma listagem dos endereços de todos os setores censitários com seus domicílios visitados. A digitação foi feita aleatoriamente à medida que as entrevistas iam sendo realizadas, sempre por setores inteiros, compondo a sua respectiva amostra: setor e quarteirões enumerados e sorteados, com uma reserva de sorteio para possíveis reposições de domicílios.

A partir desta listagem dos 1351 domicílios distribuídos em 194 setores censitários identificando 4113 pessoas, foi realizado o sorteio dos seguintes estratos: 1-11 anos (sem distinção de gênero), 12-19 /feminino, 12-19/ masculino, 20-59 /feminino, 20-59/ masculino, 60 ou mais /feminino, 60 ou mais/ masculino. Procedeu-se, então, a identificação nos domicílios que constavam na listagem.

Com o objetivo de facilitar as visitas de campo, as faixas etárias sorteadas e identificadas no domicílio correspondente foram agrupadas por proximidade utilizando-se os mapas das áreas de abrangência das Unidades de Saúde. A reposição dos domicílios e suas respectivas faixas etárias foram realizadas quando necessário. Para garantir o critério de aleatoriedade, tal reposição era realizada com o domicílio imediatamente seguinte aquele sorteado por pertencer à mesma base de seleção e manter a representatividade da amostra.

Os sujeitos foram incluídos após a assinatura do TCLE (Anexo1), sendo que para os menores de 18 anos foi solicitada a assinatura do responsável legal. Foi aplicado um questionário com duração de uma média de 10 minutos a fim de se obter as informações pessoais, as quais foram digitadas em um banco controle respeitando a amostra para cada uma das faixas etárias. O laboratório de Saúde coletiva colaborou na escolha dos domicílios, sempre agrupando endereços para facilitar o acesso e a localização da área a ser visitada.

4.4 Coleta de dados demográficos e clínicos

Antes da realização das coletas do espécime microbiológico, foi aplicado um questionário aos sujeitos da pesquisa com o propósito de determinar os fatores de risco para a aquisição de

MRSA e de subgrupos com potencial virulento. O questionário utilizado, exposto no anexo 2, abordou os seguintes dados:

- Dados demográficos (gênero, idade, cor, religião);
- Escolaridade;
- Renda familiar;
- Prática de esportes (individuais ou coletivos);
- Morbidade referida (incluindo doenças crônicas);
- Utilização de serviços de saúde (incluindo internações e outros procedimentos) nos últimos 12 meses;
- Ocorrência de infecções nos últimos 12 meses;
- Utilização de antimicrobianos nos últimos 12 meses;
- Frequência em instituição fechada (creche, casa de repouso, presídio).
- Uso de álcool e drogas ilícitas (especialmente endovenosas).

4.5 Coleta de espécimes microbiológicos

Amostras da nasofaringe foram coletadas por meio de *swabs*. A técnica de coleta incluiu a umidificação do *swab* com soro fisiológico 0,9% (técnica estéril) e introdução em ambas as narinas até a maior profundidade tolerável pelo sujeito da pesquisa e rotação da haste pressionando levemente a extremidade contra a mucosa. Os *swabs* foram transportados em meio de Stuart para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp, onde foram semeados em placas contendo Ágar-Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 48 horas, as amostras foram submetidas ao procedimento de identificação dos micro-organismos isolados.

4.6 Identificação da espécie

Os micro-organismos que se desenvolveram nas culturas foram submetidos à coloração de Gram objetivando a pureza, observação da morfologia e coloração específica. Confirmadas essas características, procederam-se as provas de catalase e coagulase em tubo conforme preconizado por Koneman et al⁶⁷. Foram realizadas provas bioquímicas adicionais com os açúcares Maltose, Trealose e Manitol para diferenciação de outras espécies de estafilococos coagulase-positiva.

Para a confirmação genotípica dos isolados de *S. aureus*, foi realizada a pesquisa dos genes 16S *rRNA* e SA442 após a extração no DNA bacteriano (Item 4.8)^{68,69} Os oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes estão descritos no quadro 3.

Quadro 3. Oligonucleotídeos para a detecção de genes do *RNAr 16 S* e SA442.

Genes	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado (bp)*
<i>RNAr 16S 1</i>	CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G	791
<i>RNAr 16S 2</i>	CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG	791
<i>SA442 1</i>	AAT CTT TGT CGG TAC ACGATA TTC TTC ACG	241
<i>SA442</i>	CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA	241

*Tamanho: tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb)

Fonte: Mason et al⁶⁸; Martineau et al⁶⁹

4.7 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados para todos os isolados através da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).⁷⁰ Para o preparo dos inóculos utilizou-se culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de Macfarland. As drogas utilizadas foram: Oxacilina (1 ug) e Cefoxitina (30 ug). Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de *swab* estéril na superfície de Ágar Mueller Hinton seguida da aplicação dos discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas, sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação com base nas normas estabelecidas pelo CLSI. A linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle em todos os experimentos.

Para as amostras que apresentaram resistência, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método do E-test com os antimicrobianos oxacilina e vancomicina, conforme orientações do fabricante. Os resultados da CIM foram categorizados em sensível, intermediário e resistente, de acordo com as definições do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.⁷⁰ (Quadro 4).

Quadro 4. Limites da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) para categorização de *Staphylococcus aureus*.

Interpretação CIM ($\mu\text{g/mL}$) – <i>Staphylococcus aureus</i>			
Agente antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4
Vancomicina	≤ 2	4-8	≥ 16

Fonte: CLSI⁷⁰

4.8 Extração do ácido nucleico para pesquisa genotípica

Para a extração ácido nucleico, utilizou-se o Kit Illustra (GE *healthcare*) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). Adicionando na sequência 500 μL da solução de extração à mistura e centrifugando a mesma a 10.000 x g por 4 min, o sobrenadante obtido 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 foram adicionados novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 μL da solução de lavagem foram acrescentados à coluna e esta foi submetida à centrifugação a 20.000 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 foi aquecida a 70°C e utilizada para a eluição.

4.9 Detecção do gene *mecA* e caracterização de SCC*mec*

As reações de PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros e primers descritos por Murakami et al⁷¹. Em todas as reações realizadas utilizaram-se linhagens de referência internacional como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923). A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se um método de reação PCR-Multiplex, com primers (Quadro 5) conforme descrito por Milheiriço et al⁷² e também por Oliveira e Lencastre.⁷³

Quadro 5. Oligonucleotídeos para a detecção do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

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

SCC*mec*/R*: Tipo de SCC*mec*/ Região *Tamanho: tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb). Fonte: Milheirinho et al.⁷² e Oliveira e Lencastre⁷³

4.10 Pulsed-field gel electrophoresis

A tipagem por PFGE foi realizada segundo o protocolo modificado de McDougal et al.⁷⁴ As amostras foram colocadas em caldo BHI para crescimento por 24h. Em um microtubo

previamente pesado, 0,5ml da amostra crescida foi centrifugado a 12.000 rpm por 50s. Depois de desprezado o sobrenadante, pesou-se novamente o microtubo e foram adicionados 300µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) mais a diferença entre o peso final e inicial em ml. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min. a 37°C, agitadas em vortex, e em seguida adicionadas de 5µl de Lisostafina (1mg/ml em 20mM de acetato de sódio [pH 4,5]) e de 300µl de agarose *low melt*.

As amostras foram distribuídas nos moldes para plugues e, após a solidificação dos mesmos, 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% desoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) foram adicionados aos plugues e estes incubados a 37° C por pelo menos 4h. O EC foi retirado e os plugues lavados com 2ml de TE quatro vezes a temperatura ambiente por meia hora. A restrição do DNA genômico foi realizada com a enzima *SmaI* (*Fast Digest SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) em 50µl de tampão de restrição.

A eletroforese foi realizada no aparelho CHEF-DR III System (*BioRad Laboratories*, EUA) em gel de agarose a 1% (*Pulsed Field Certified Agarose*, *BioRad Laboratories*, EUA) feita com TBE 0,5X sob as seguintes condições de corrida: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 0,5X TBE como tampão de corrida. Como marcador molecular, utilizou-se *Lambda Ladder PFG Marker* (New England BioLabs). Os géis foram corados com GelRed (10.000X em água, Biotium, EUA) por 45min. e fotografados sob transiluminação UV.

Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando-se o software de bioinformática BioNumerics versão 6.1 (Applied Maths, Bélgica). Foram analisados os agrupamentos realizados pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) com pelo menos quatro amostras apresentando coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$, otimização de 0,5% e tolerância de 1,25%.³³ Os agrupamentos com estas condições foram identificados por letras maiúsculas.

A cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325 foi utilizada para a normatização dos géis (número de acesso GenBank CP000253). Para comparar as amostras do estudo, foi realizada a análise das cepas de MRSA representantes de clones mundiais ou locais obtidas da Universidade de Juntendo, Tóquio, primeiramente cedidas pelo Prof. Keiichi Hiramatsu ao Prof. Antonio Carlos Campos Pignatari (UNIFESP) que por sua vez as concedeu para este estudo: NCTC 10422 (*SCCmec* tipo I), N315 (*SCCmec* tipo II), 85/2082 (*SCCmec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (*SCCmec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (*SCCmec* tipo IVb), MR 108 (*SCCmec* tipo IVc), JCSC 4469 (*SCCmec* tipo IVd), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (*SCCmec* tipo V), A1721/HU25 (Clone Brasileiro Epidêmico, *SCCmec* tipo III), WB72 (USA 300, *SCCmec* tipo IV), MW2

(USA 400, SCCmec tipo IV), WB49 (Oceania South Pacific Clone, SCCmec IV), HAR24 (EMRSA - 15, SCCmec tipo IV), HAR24 (EMRSA - 16, SCCmec tipo II), BK2464 (New York - Japan, SCCmec II), HDE288 (Clone Pediátrico / USA800, SCCmec IVa).

4.11 Pesquisa de genes de virulência

Enterotoxinas e TSST-1: As reações de PCR para a detecção dos genes das enterotoxinas A, B, C e da TSST-1 foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al.⁷⁵ e Cunha et al.⁷⁶ Os primers utilizados estão descritos no quadro 6. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Saber Safe.

Genes lukS-PV – lukF-PV da leucocidina Pantón-Valentine: As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10pmol de cada primer (Quadro 7), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. A incubação foi executada em termociclador apropriado, sendo que a amplificação para detecção dos genes *lukS-PV – lukF-PV* consistiu em 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. Completados os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72° C por cinco minutos antes de se resfriarem a 4° C. Em todas as reações realizadas utilizaram-se linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 49775) e negativo (*S. aureus* ATCC 29213).⁷⁷

Hemolisinas alfa e delta : As reações de PCR para os genes das hemolisinas alfa e delta (*hla* e *hld*), assim como os primers utilizados, foram baseadas segundo descrito por Marconi et al.⁷⁸

Toxinas Esfoliativas: As reações para os genes das toxinas esfoliativas (*eta* e *etb*) foram realizadas segundo descrito por Koning et al.⁷⁹

Biofilme: Para a amplificação dos genes *icaA* e *icaD* relacionados com a produção de biofilme foram empregados os parâmetros descritos por Arciola et al.⁸⁰

Quadro 6. Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de PCR para a detecção de genes de virulência.

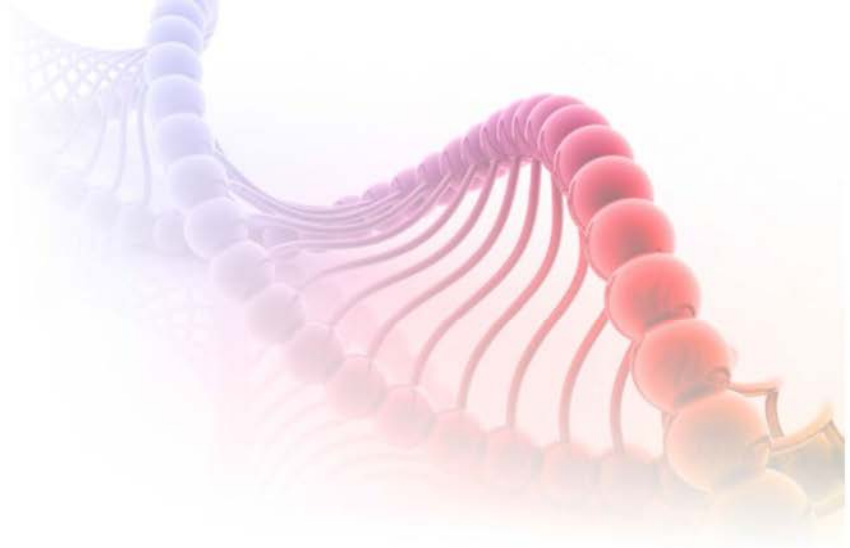
Fator de virulência	Gene	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto (bp)*	Controle (+)
Enterotoxinas 75,76	<i>sea</i>	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120	<i>S. aureus</i>
		GAACCTTCCCATCAAAAACA		ATCC 13565
	<i>seb</i>	TCGCATCAAACGACAAACG	478	<i>S. aureus</i>
		GCAGGTACTCTATAAGTGCC		ATCC 14458
	<i>sec-1</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	<i>S. aureus</i>
		AAATCGGATTAACATTATCC		ATCC 19095
Toxina da Síndrome do Choque Tóxico 75,76	<i>tst</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	<i>S. aureus</i>
		TTTCCAATAACCACCCGTTT		ATCC 51650
Leucocidina de Pantón Valentine 77	<i>Luk-PV</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCC	433	<i>S. aureus</i>
		A GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		ATCC 49775
Biofilme 78	<i>icaA</i>	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	188	<i>S. epidermidis</i>
		TCAGGCACTAACATCCAGCA		ATCC 35984
	<i>icaD</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	<i>S. epidermidis</i>
		CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		ATCC 35984
Toxinas Esfoliativas 77	<i>eta</i>	CTAGTGCATTTGTTATTCAA	119	<i>S. aureus</i>
		TGCATTGACACCATAGTACT		ZM**
	<i>etb</i>	ACGGCTATATACATTCAATT	200	<i>S. aureus</i>
		TCCATCGATAATATACCTAA		N5**
Hemolisinas 78	<i>hla</i>	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	<i>S. aureus</i>
		CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		N315**
	<i>hld</i>	ATGGCAGCAGATATCATTTTC	357	<i>S. aureus</i>
		CGTGAGCTTGGGAGAGAC		ATCC 19095

*Tamanho: tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb); **Cepas gentilmente cedidas pela

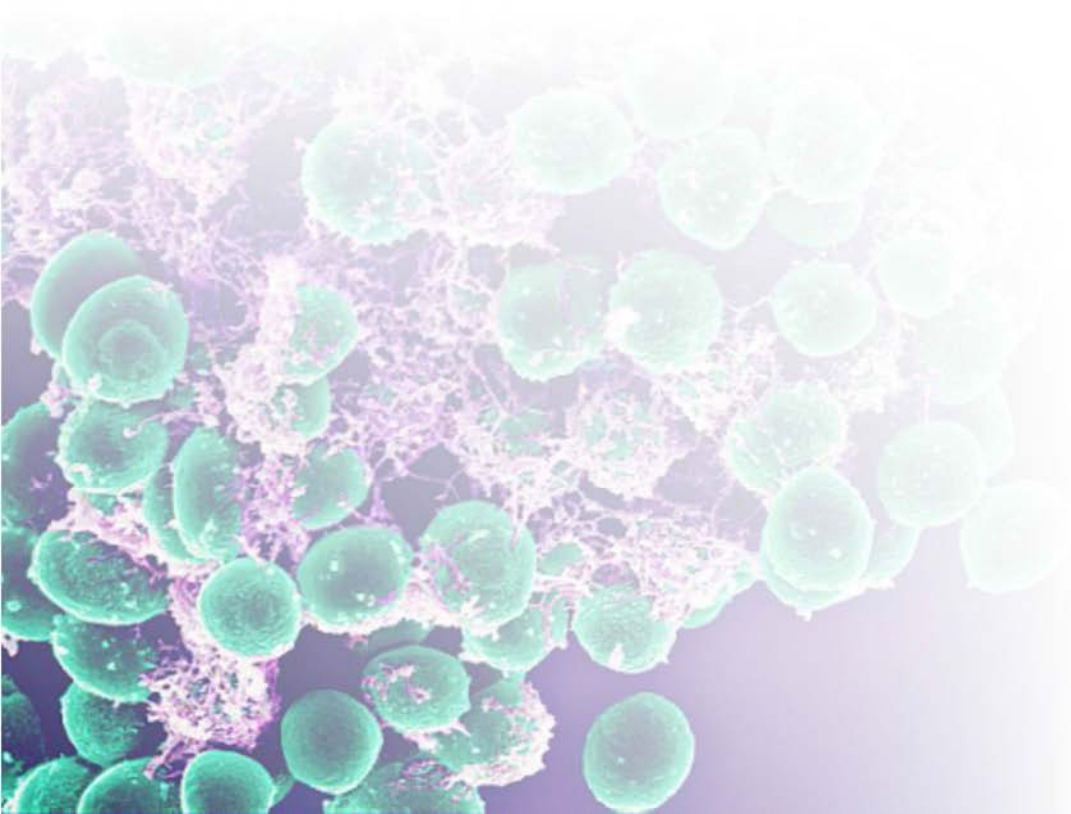
Profa. Dra Elza Mamizuka (USP)

4.12 Análise estatística dos resultados

Para a coleta e análise dos dados foram utilizados os softwares EPI-INFO for windows, versão 3.2 (© *Centers for Disease Control and Prevention*, USA) e SPSS versão 16.0 (© SPSS, inc.). Foram aplicados os procedimentos rotineiros para análise de estudos de delineamento transversal. A base do estudo foi formada pelos sujeitos que apresentaram cultura positiva para *S. aureus* carreando genes de virulência. Empregou-se uma análise uni e multivariada de regressão linear (método *Backward Stepwise Conditional*) para fatores de risco associados ao número de genes de virulência.



5. Considerações Acerca da Metodologia



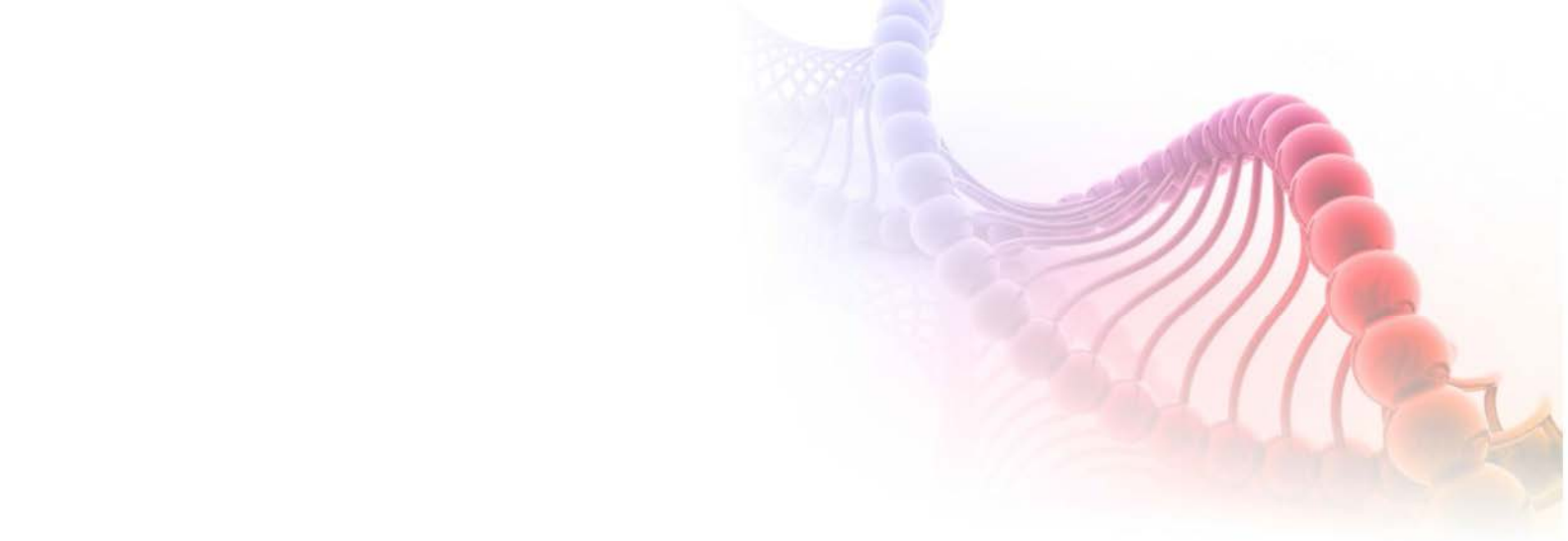
5. CONSIDERAÇÕES ACERCA DA METODOLOGIA

- O teste de resistência a metilina/oxacilina considerado “padrão-ouro” foi a identificação do gene *mecA* pela PCR. No entanto, testes de difusão em disco com as drogas Cefoxitina e Oxacilina e o método do E-test com fitas de oxacilina foram realizados concomitantemente.
- Os sujeitos “primários” ou seja, identificados na primeira busca, positivos ou não para *S. aureus* ou MRSA, foram submetidos à pesquisa dos genes de virulência e incluídos nas análises estatísticas. Os sujeitos “secundários”, identificados em busca de contactantes domiciliares de colonizados por MRSA, não foram incluídos nessas análises.

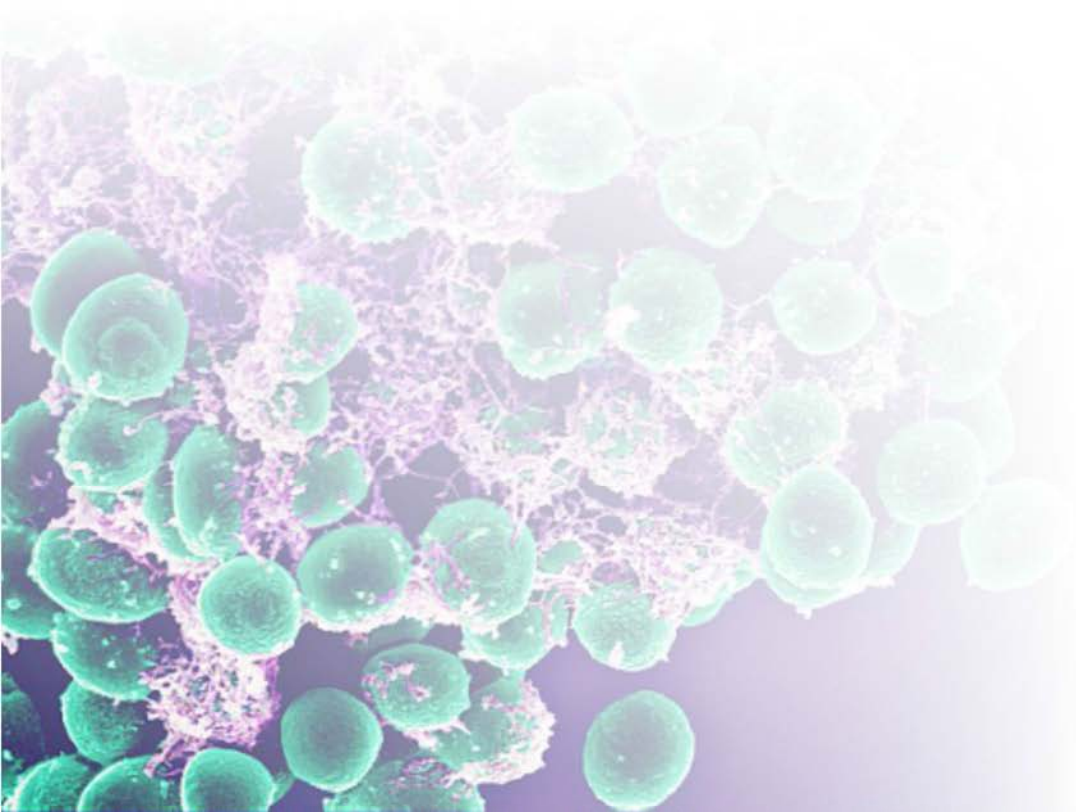
5.1 Orientações aos sujeitos da pesquisa

- *Autonomia e confidencialidade:* Os sujeitos foram incluídos na pesquisa após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 1). Enquanto que para os sujeitos menores de 18 anos foi solicitada a assinatura do responsável legal, para aqueles com 12 anos ou mais foi também solicitado seu consentimento assinado. A total confidencialidade dos dados, bem como a possibilidade de retirar-se da pesquisa se assim achar conveniente, foi garantida a todos os sujeitos
- *Riscos:* A coleta de *swab* de nasofaringe é um procedimento não invasivo, que causa mínimo desconforto e foi realizada por enfermeiras previamente capacitadas. Assim sendo, os riscos para os sujeitos da pesquisa foram ínfimos.
- *Benefícios individuais:* a colonização nasal por *S. aureus* é um fenômeno comum e não acarreta em si riscos significativos aos pacientes. Procedimentos de descolonização não são indicados para esse grupo, mas indivíduos colonizados que apresentem infecções de repetição na pele ou em outros sítios podem beneficiar-se da descolonização.⁸¹ Sujeitos nessas condições foram submetidos à descolonização com Mupirocina nasal aplicada duas vezes ao dia por cinco dias.
- *Benefícios indiretos:* Este estudo teve grande importância para o mapeamento dos carreadores de *S. aureus* na comunidade, bem como da distribuição dos genes de virulência carreados por essas cepas. Além disso, a identificação de indivíduos

colonizados por MRSA pode embasar estratégias preventivas e ter potencial implicação sobre protocolos terapêuticos.



6. Resultados



6. RESULTADOS

6.1 Amostragem

Ao todo, obteve-se um total de 686 amostras, obtidas a partir de 686 coletas com *swab* nasal em indivíduos hígidos da população de área urbana do município de Botucatu – SP. Dos espécimes analisados, 223 foram identificados como *Staphylococcus aureus* e 463 como Estafilococos coagulase-negativa - ECN (Figura 2). Constatou-se, portanto, prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* de 32,5% (95% CI = 29.2% -36.2%). As análises subsequentes foram realizadas com as 223 amostras positivas para *S. aureus*.

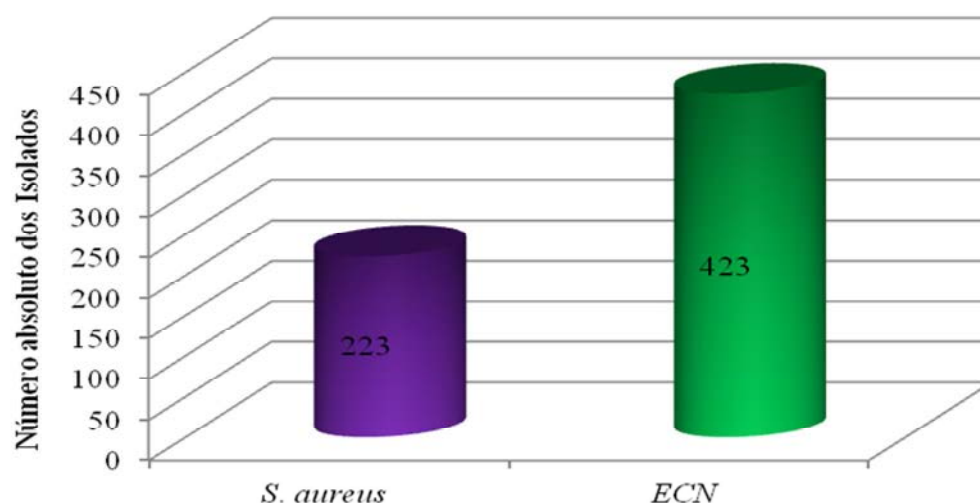


Figura 2. Distribuição das 686 amostras de *Staphylococcus* spp. coletadas com swabs nasais em indivíduos hígidos do município de Botucatu.

6.2 Determinação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

Todas as 223 amostras positivas para *S. aureus* foram submetidas aos testes de susceptibilidade antimicrobiana utilizando as drogas oxacilina e cefoxitina. O método de disco-difusão revelou 6 amostras resistentes, das quais 2 foram resistentes à oxacilina (halo ≤ 10) e 3 resistentes à cefoxitina (halo ≤ 21). Os isolados que apresentaram resistência à meticilina foram analisados pelo método E-test utilizando fitas impregnadas com oxacilina e vancomicina para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), como evidencia a tabela 1. É digno de nota que um dos isolados (341-S) que se mostrou sensível tanto no teste disco-difusão quanto no E-test apresentou resistência no teste genotípico. Além disso, para a análise complementar do perfil

de resistência das amostras de MRSA, foi realizado o teste de susceptibilidade antimicrobiana para as drogas Levofloxacina, Gentamicina, Clindamicina, Eritromicina, Sulfametoxazol e Penicilina, incluindo o teste D, como se pode observar na tabela 2

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação da susceptibilidade antimicrobiana pelos métodos de disco-difusão e E-test.

Amostra	Disco – Oxa mm	Disco – Cefo mm	E-test Oxa (CIM) µg/mL	E-test Vanco (CIM) µg/mL
103	19 S	11 R	12 R	1,5 S
106	16 S	13 R	6 R	0,5 S
251	14 S	13 R	6 R	0,5 S
341-S	15 S	26 S	0,38 S	1,5 S
610	6 R	15 R	16 R	2,0 S
661	0 R	12 R	12 R	1,5 S

Oxa – Oxacilina; Cefo – Cefoxitina; Vanco – Vancomicina; CIM – Concentração Inibitória Mínima.

S – Sensível; R – Resistente

Tabela 2. Perfil de resistência das amostras de MRSA, obtido através do método de disco-difusão com as drogas Levofloxacina, Gentamicina, Clindamicina, Eritromicina, Sulfametoxazol, Penicilina e teste D.

Amostra	Levo mm	Genta mm	Clinda mm	Eritro mm	Sulfa mm	Pen mm	Teste D
103	28 S	20 S	29 S	28 S	27 S	40 S	Negativo
106	29 S	20 S	24 S	26 S	23 S	10 R	Negativo
251	24 S	21 S	25 S	26 S	28 S	9 R	Negativo
341-S	30 S	21 S	22 S	8 R	29 S	14 R	Positivo
610	26 S	21 S	27 S	16 I	26 S	11R	Negativo
661	24 S	20 S	27S	26 S	25S	11R	Negativo

S – Sensível; R – Resistente; I – Intermediário

6.3 Detecção do gene *mecA* (de resistência à meticilina) e caracterização do SCC_{mec}

Das 223 amostras de *S. aureus* estudadas, 6 (0,9%) delas foram positivas para o gene *mecA* (Figuras 3 e 4). Dos 15 contactantes de sujeitos positivos para MRSA, 2 apresentaram o gene de resistência (Figura 3).

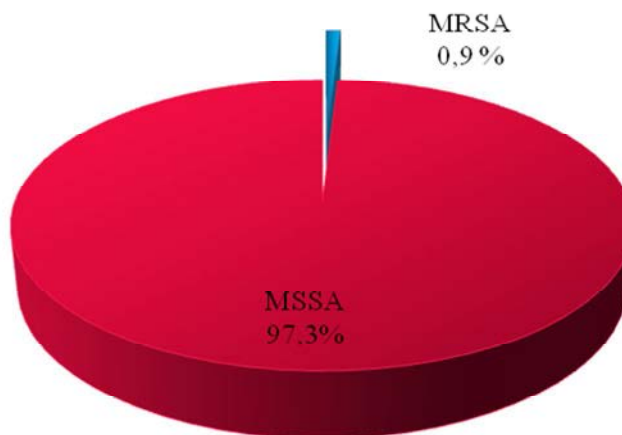


Figura 3. Presença do gene *mecA* em amostras colonizantes nasais de *S. aureus*

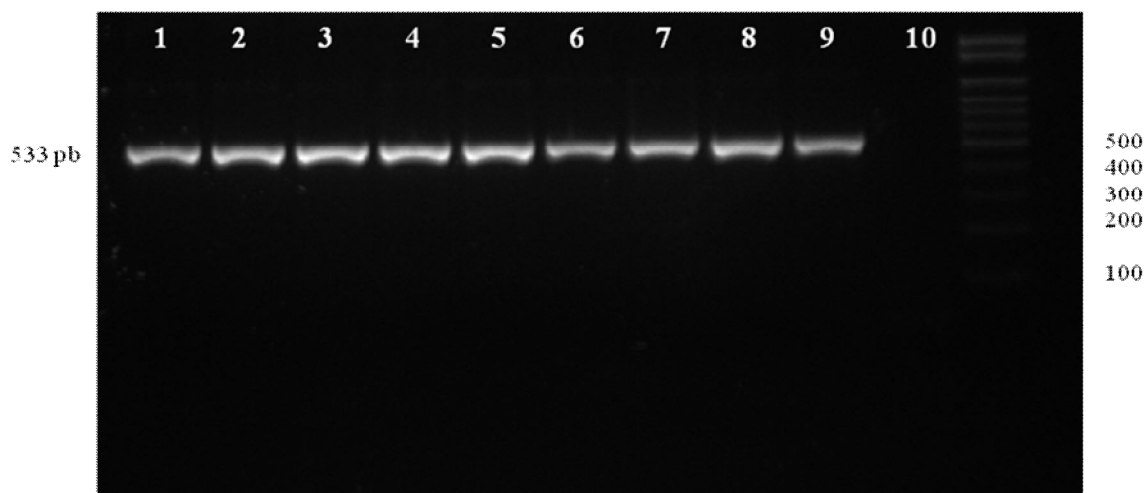


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando amostras de *S. aureus*, *mecA* positivas nos poços 1 a 8, sendo 7 e 8 contactantes, poço 9 controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e o poço 10 controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tem-se, portanto, que a prevalência de resistência entre os contactantes foi de 13,3% (IC95%=2,3%-35,5%). Em relação à população geral do estudo, esse resultado foi significativamente superior: RR=15,24 (IC95%=3,34-69,44; p=0,02). Todos os espécimes resistentes albergaram o SCCmec IV (Figura 5).

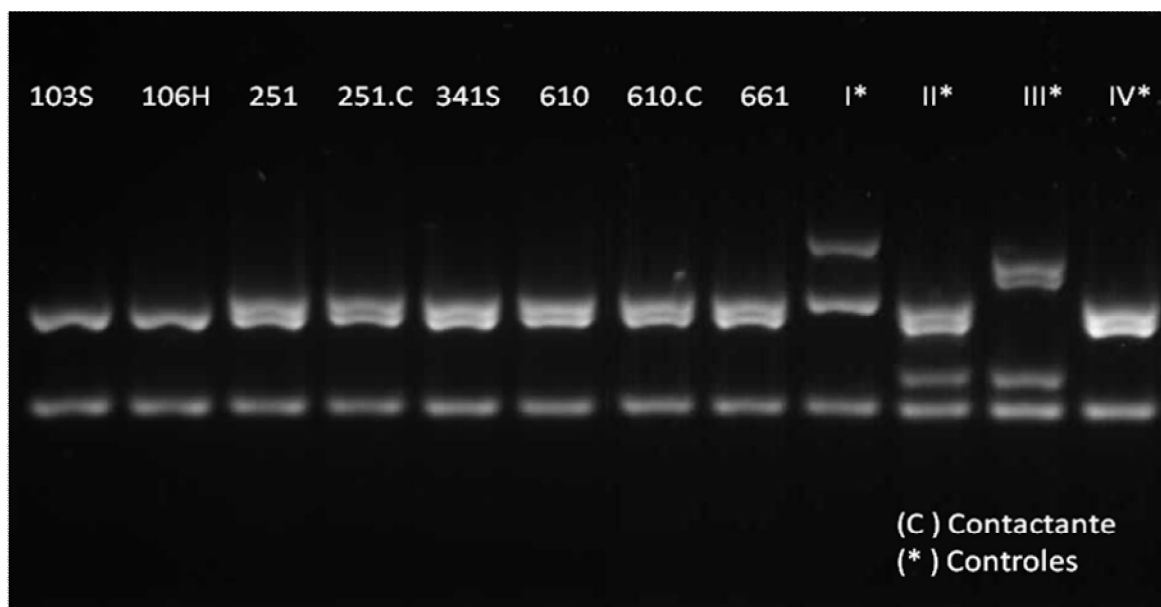


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 2% (corado com SYBR® Safe) evidenciando produtos amplificados do SCCmec em *S. aureus*. Amostras SCCmec positivas tipo IV, 103S-661, incluindo dois contactantes. Cepas controle, I*: COL, II*: PER34, III*: AN546, IV*: MW2

6.4 Distribuição dos genes de virulência

Em relação à distribuição dos genes das enterotoxinas, *sea* foi o mais frequente 30,9% (69), seguido de *sec* 17,5 % (39) e *seb* 14,3% (32). Um percentual considerável de isolados 28,7% (64) apresentou o gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico. Das cepas carregando o gene da PVL, obteve-se um total de 2,2% (5). Vale ressaltar que não houve associação entre a presença do gene de resistência e a do gene codificador da Leucocidina de Panton-Valentine.

Os genes das esfoliatinas A e B foram detectados em apenas 1,3% das amostras. Em contrapartida, 89,7% (200) e 93,3% (208) dos isolados foram positivos para os genes das hemolisinas alfa e delta, respectivamente. Somente dois isolados apresentaram o gene *icaA*, enquanto 95,5% (213) foram carreadores do gene *icaD* (Figura 6).

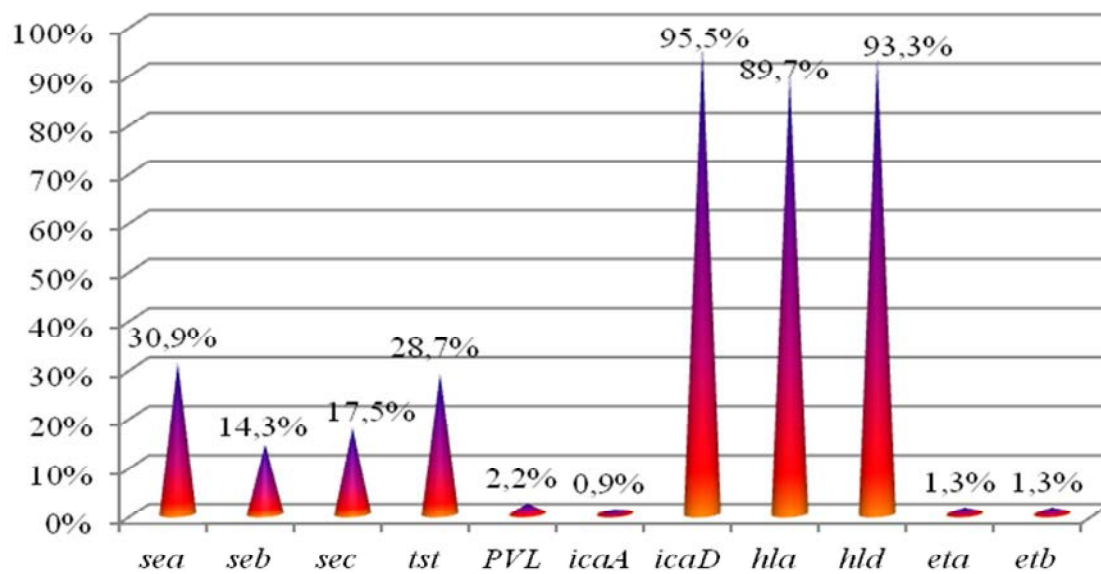


Figura 6. Distribuição dos genes de virulência em amostras de *S. aureus*.

6.5 Identificação dos fatores de risco

Os resultados obtidos através de análise univariada por regressão linear dos fatores de risco para carregamento nasal de *S. aureus* albergando genes de virulência em indivíduos saudáveis estão expostos na tabela 3. A análise revelou duas associações negativas estatisticamente significantes entre os fatores de risco idade e diabetes mellitus. A tabela 4 mostra os resultados obtidos na análise multivariada por regressão linear, onde permaneceu a associação negativa entre o fator de risco diabetes mellitus e a presença dos genes de virulência. Os demais fatores de risco não apresentaram resultados estatisticamente significantes.

Tabela 3. Resultados de regressão linear univariada (método *Backward Stepwise Conditional*) para fatores de risco associados ao número de genes de virulência

Fator de Risco	B*	Intervalo de Confiança - IC	P - Valor	Coefficiente Beta
Idade	- 0,07	- 0,014 – 0	0,036	- 0,14
Masculino	- 0,098	- 0,37 – 0,178	0,48	- 0,047
Fundamental Completo	- 0,053	- 0,329 – 0,223	0,71	- 0,025
Renda Familiar	- 0,006	- 0,015 – 0,002	0,13	0,102
Prática de Esportes	- 0,044	- 0,3352 – 0,263	0,78	- 0,019
Piercings	0,250	- 0,540 – 1,040	0,53	0,042
Tatuagens	0,022	- 0,484 – 0,528	0,93	0,006
Doença Cardíaca	- 0,263	- 1,300 – 0,775	0,62	- 0,034
Doença Pulmonar	0,188	- 0,361 – 0,738	0,50	0,045
Doença Neurológica	0,657	-0,270 – 1,584	0,16	0,094
Diabetes Mellitus	- 1,389	- 0,270 – (-0,477)	0,003	- 0,198
Neoplasia	- 0,765	- 2,223 – 0,693	0,30	- 0,069
Infecções de Pele	- 0,102	- 0,547 – 0,342	0,65	- 0,030
Pneumonias	0,583	- 0,610 – 1,77	0,34	0,065
Uso de Antibióticos	0,152	- 0,167 – 0,472	0,35	0,063
Internação	- 0,223	- 0,820 – 0,354	0,44	- 0,053
Esteróides	0,756	- 0,278 – 1,789	0,151	0,096
Etilismo atual	- 0,067	- 0,471 – 0,337	0,75	- 0,022
Tabagismo atual	- 0,173	- 0,655 – 0,308	0,48	-0,048
Creches	- 0,076	-0,610 – 0,458	0,78	- 0,019
Gene <i>mecA</i>	- 0,094	- 0,0945 – 0,758	0, 83	- 0,015

*B – Valor numérico da estimativa do parâmetro diretamente associado a uma variável independente.

Tabela 4. Resultados de regressão linear multivariada (método *Backward Stepwise Conditional*) para fatores de risco associados ao número de genes de virulência

Fator de Risco	B*	Intervalo de Confiança - IC	P - Valor	Coefficiente Beta
Idade	- 0,008	- 0,012 – 0,001	0,10	- 0,110
Diabetes Mellitus	- 1,259	- 2,181 – (- 0,337)	0,008	- 0,337

*B – Valor numérico da estimativa do parâmetro diretamente associado com uma variável independente.

6.6 Perfil clonal dos isolados de *S. aureus* (tipagem por PFGE)

A análise por PFGE permitiu identificar a presença de 11 *clusters* (A-L) bem definidos e distribuídos pela população (Figura 7), considerando sua definição previamente estabelecida (agrupamentos de 4 isolados ou mais, com similaridade $\geq 80\%$). Foram analisadas as 223 amostras de *S. aureus*, das quais 28 foram repetidamente não-tipadas. Dos 11 grupos encontrados, identificou-se 3 *clusters* majoritários (E, G e H) que albergavam um número consistente de isolados carreando genes de virulência (Tabela 5), sendo portanto destacados como os mais prevalentes e virulentos encontrados no município.

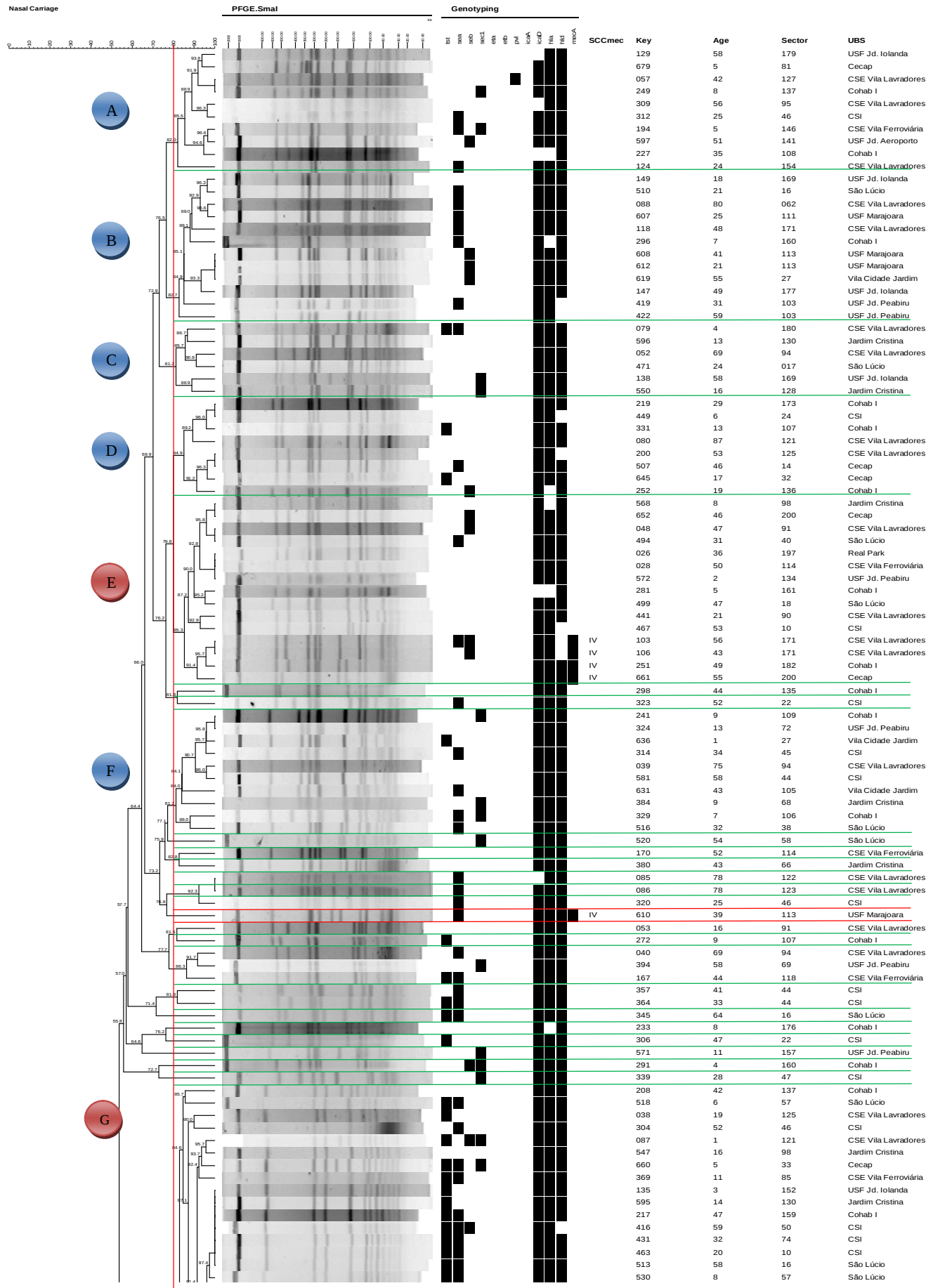
Dentre esses *clusters* principais, o grupo E reuniu maior quantidade de cepas resistentes (4), embora tenha apresentado prevalência inferior em relação ao carregamento dos genes de virulência. Por conseguinte, o *cluster* H exibiu um número consistente de cepas albergando fenótipos de virulência. Já o grupo G, maior *cluster* identificado, concentrou um percentual superior de amostras com genes de virulência, incluindo um isolado resistente que despontou similaridade de 80,2% entre as demais cepas sensíveis. Nesse sentido, obteve-se 2 *clusters* importantes contendo isolados de CA-MRSA agrupados com cepas sensíveis (Figura 8).

Quando realizada a clusterização por positividade dos fenótipos de virulência mais frequentes, foram identificados 3 *clusters* para o gene *tst* (incluindo um clone majoritário com 32 isolados – 80,6% similaridade), 5 para o gene *sea* (1 clone majoritário com 21 isolados - 81,9% similaridade), 2 pequenos *clusters* para o gene *seb* e *sec*, 11 para *hla* (3 clones majoritários de 13 [84,3%], 22 [81,5%] e 40 amostras [80,1%]), e por fim 10 para o gene da *hld* (3 clones principais com 15 [81,6%], 29 [82,3%] e 40 [82,6%] espécimes)

Tabela 5. Principais *clusters* identificados associados à presença de genes de virulência.

<i>Cluster</i>	E	G	H
Número de Isolados	15	44	31
Proporção (%) total de amostras	6.7	19.7	13.9
Similaridade dos <i>clusters</i> (%)	85.3	80.2	81.6
Prevalência dos GV* (%)			
<i>tst</i>	-	81.8	22.5
<i>sea</i>	13.3	56.8	19.3
<i>seb</i>	26.6	6.8	9.6
<i>sec</i>	-	9.0	32,2
<i>eta</i>	-	-	-
<i>etb</i>	-	2.3	-
<i>pvl</i>	-	2.3	-
<i>icaA</i>	-	-	-
<i>icaD</i>	93.3	100.0	96.7
<i>hla</i>	86.6	90.9	74.1
<i>hld</i>	80.0	93.1	93.5
<i>mecA</i>	26.6	2.3	-

GV*: Genes de virulência



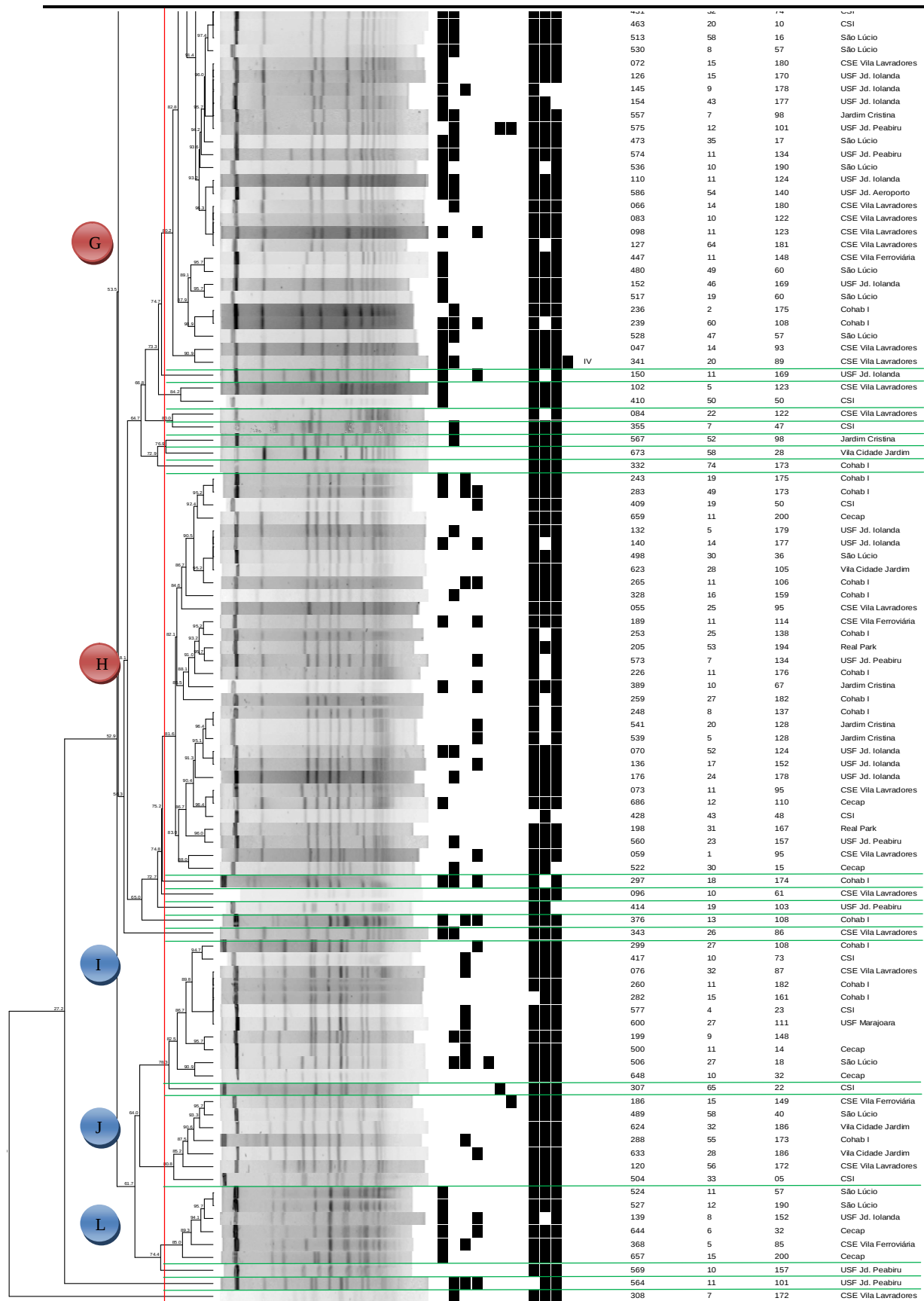


Figura 7. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de 195 isolados de *S. aureus* e MRSA provenientes de indivíduos hígidos da população.

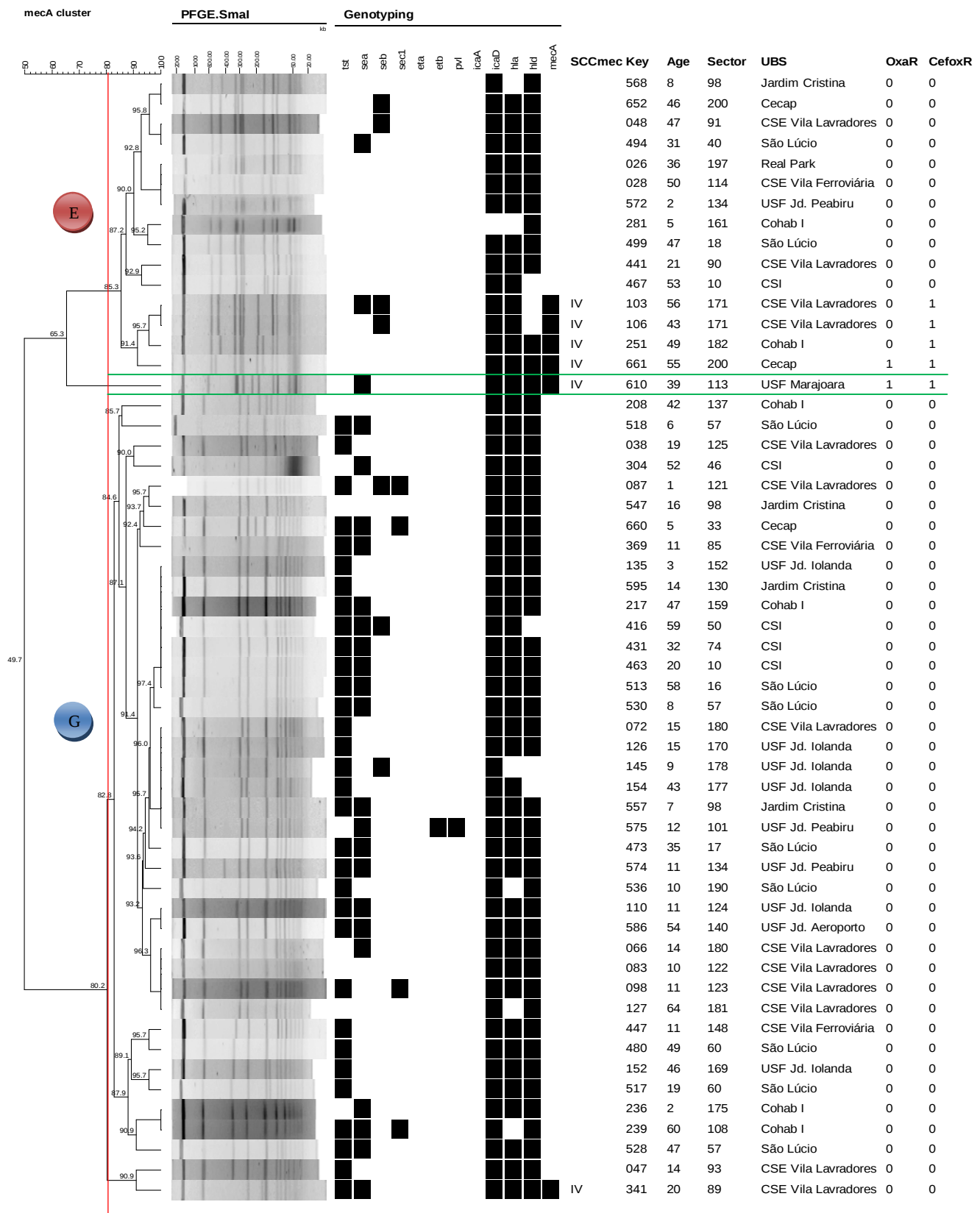


Figura 8. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (*Bionumerics Applied Maths*), dos perfis PFGE - *SmaI* de isolados de CA-MRSA e cepas relacionadas (sensíveis) provenientes de indivíduos hígidos da população.



7. Discussão

7. DISCUSSÃO

S. aureus é um potente patógeno responsável por acentuadas taxas de morbidade e mortalidade humana ao longo da história. A emergente disseminação dessa espécie, em especial na sua forma resistente MRSA, externa ao ambiente hospitalar e instalações de atenção à saúde, ocupa um espaço dentre os principais problemas salutarres em âmbito mundial, atingindo indivíduos de todos os gêneros e grupos etários.^{58,82} Recentemente, um modelo matemático determinístico previu que as cepas MRSA adquiridas na comunidade se tornarão dominantes em instituições hospitalares e estabelecimentos de saúde mediante à expansão desses reservatórios no ambiente comunitário e à crescente admissão de indivíduos portadores da estirpe em hospitais.³²

Em virtude dessa problemática, estudos de base populacional têm sido realizados, com a finalidade de ilustrar o perfil epidemiológico das populações de *Staphylococcus aureus* como colonizantes e agentes de infecção. No Brasil, contudo, até o presente momento não foram descritos resultados de inquéritos de base populacional sobre o carreamento de *S. aureus* e MRSA e nem a análise do perfil de virulência desses micro-organismos. Sendo assim, esse trabalho visa preencher tal lacuna, fornecendo dados que podem contribuir para o embasamento de condutas clínicas e de saúde pública.

Os resultados da prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* (32,5 %) e MRSA (0,9%) obtidos no presente estudo apresentaram impressionante semelhança com os reportados pelo inquérito norte-americano do NHANES o qual identificou taxas de 32,4% para *S. aureus* e 0,8% para MRSA em isolados da mucosa nasal de indivíduos saudáveis.⁴⁵ Em estudos delineados nas extremidades dos continentes americano e europeu, ambos avaliando a prevalência de carreamento nasal em portadores saudáveis, as taxas de colonização de *S. aureus* e MRSA foram 22 e 12,6%; e 19,1 e 0,4% respectivamente.^{83, 49} Um pouco mais distante, no continente asiático, um trabalho desenvolvido no período de 2004 a 2009, avaliou a prevalência anual e características microbiológicas de MRSA em isolados nasais de crianças hígdas, revelando culturas positivas para *S. aureus* em 824 (25,8%) dentre 3200 crianças, e colonização por MRSA em 371 (11,6%) delas.¹¹ As taxas de prevalência de colonização por *S. aureus* têm se mostrado variáveis nos países ao redor do mundo estando diretamente ligadas ao tipo e ao cenário de cada população estudada.

Como ressaltado anteriormente, os relatos de CA-MRSA no Brasil ainda são escassos, e referem-se principalmente a taxas de colonização em sujeitos submetidos a serviços de atenção à saúde e relatos de casos clínicos de infecção por esse agente. Entre os poucos achados brasileiros, encontra-se o estudo desenvolvido por Scribel et al⁵⁷ na cidade de Porto Alegre o

qual identificou a prevalência de MRSA em indivíduos atendidos em uma Unidade Básica de Saúde (UBS), obtendo 11,5% de colonização por *S. aureus* e nenhum sujeito carreador de MRSA, dado esse atípico nessa localidade por ser considerada um centro principal de relatos de casos de CA-MRSA no Brasil até o momento. Neste mesmo cenário nacional, outro estudo encontrado foi realizado com 1192 crianças que frequentavam creches e eram atendidas em centros de cuidados diários, o qual identificou a presença de carreamento de *S. aureus* em 371 (31,1%) e MRSA em 14 (1,2%) das crianças estudadas⁵⁸

Na presente pesquisa foram encontrados seis carreadores nasais de CA-MRSA, todos albergando SCCmec tipo IV, tipicamente alocado na comunidade. Outro estudo realizado por Pereira⁸⁴, previamente conduzido no município de Botucatu porém analisando isolados de feridas de pacientes atendidos em UBS, encontrou CA-MRSA carreador de SCCmec tipo IV.⁸⁴ De forma similar, Bonesso⁸⁵ realizou culturas em lesões de pele de pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, também com achado de MRSA com SCCmec IV, ratificando os resultados obtidos com isolados de portadores saudáveis de CA-MRSA da população urbana do município.

Além deste, outro fato relevante comum entre os trabalhos supracitados foi a ausência de correlação entre as cepas de CA-MRSA regionalmente distribuídas e o gene codificador da PVL^{84,85}, o quê contrapõe a afirmativa de que o gene desse importante fenótipo de virulência seja um bom marcador entre cepas de CA-MRSA.^{86, 87} A PVL confere maior virulência às cepas de *S. aureus* e acredita-se que essa toxina seja um fator chave na patogênese de pneumonias necrotizantes.⁸⁷ No atual estudo foram encontrados três isolados carreando o gene da PVL, sendo todos eles sensíveis à meticilina. De acordo com Kreienbuehl et al⁸⁸, na Europa a maioria dos isolados carreando genes da PVL são MSSA. Relatos do Reino Unido revelaram um aumento de cepas de *S. aureus* PVL positivas no período de 2005-2009, em que maioria dos isolados também se mostrou sensível à meticilina. Utilizando ferramentas de biologia molecular, o mesmo autor referiu-se à existência de grande semelhança genética entre cepas sensíveis e resistentes carreando genes da PVL, o quê sugere que as primeiras tenham se constituído reservatório para as últimas.⁸⁸

Os achados referentes aos testes fenotípicos de resistência, pelos métodos de disco-difusão e E-test foram concordantes com a análise genotípica, exceto por uma amostra que apresentou susceptibilidade à oxacilina fenotipicamente, sendo em contrapartida, carreadora do gene *mecA*. Esse isolado também exibiu CIM reduzida à droga pelo método E-test. A este fenômeno atribui-se o nome de heterorresistência, termo amplamente utilizado definido como resistência expressa a certos antibióticos por uma parte das células de uma população bacteriana, que geralmente são consideradas sensíveis a esses antimicrobianos mediante testes de

susceptibilidade *in vitro* tradicionais. Vários fatores podem contribuir para que tais cepas adquiram total resistência no futuro.⁸⁹

Entende-se que presença do gene *mecA* é um determinante genotípico de resistência à meticilina. No entanto, algumas cepas de MRSA em especial as de CA-MRSA podem apresentar uma CIM reduzida à oxacilina, com *breakpoint* ≤ 2 , segundo critérios do CLSI. Chen et al⁹⁰ relataram recentemente a presença de cepas que se pensava serem sensíveis à oxacilina, albergando o gene *mecA*, sendo esses *mecA* positivos com CIM reduzida pertencentes ao clone dominante Taiwan CA-MRSA (SCC*mec* IV e V). Esse estudo ressaltou a dificuldade muitas vezes encontrada de identificação adequada de MRSA pelos métodos fenotípicos, que provavelmente tem contribuído para a disseminação de CA-MRSA nos serviços de saúde e comunidade.⁹⁰ Falagas et al⁸⁹ acrescentam que cepas heterorresistentes têm sido profundamente responsáveis por falhas na terapêutica, representando outra questão relevante relacionada ao tratamento de infecções

Frente à distribuição dos demais genes de virulência pesquisados, pode-se identificar uma prevalência significativa dos genes das enterotoxinas clássicas *sea* (30,9%), *seb* (14,3%) e *sec* (17,5%) e também o gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico que merece destaque com a taxa de 28,7%. Esses genes prevalentes (*sea*, *seb*, *sec* e *tst*) codificam as enterotoxinas clássicas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico, as quais compõem a classe de superantígenos, ou seja, potentes toxinas imunoestimulatórias. As enterotoxinas foram originalmente definidas por sua capacidade de causar intoxicação alimentar, incluindo quadros de êmese⁹¹ e gastroenterite por um mecanismo que ainda não é completamente compreendido.⁹² Porém, além dessas características, a enterotoxina A parece desempenhar um papel chave na septicemia por *S. aureus*,⁹¹ enquanto os superantígenos SEB e SEC têm exibido uma associação a quadros de síndrome do choque tóxico em sua forma não menstrual.⁹³

A representação mais comum da síndrome do choque tóxico não-menstrual é a doença após a infecção viral das vias aéreas superiores. Sugere-se que as proteases produzidas por várias estirpes de *S. aureus* ativam a hemaglutinina do vírus da gripe facilitando o poder do vírus para iniciar a infecção, o que por sua vez cria um sítio epitelial danificado permitindo a infecção secundária por *S. aureus*.⁹⁴ O ambiente comunitário é propício ao desenvolvimento de infecções de vias aéreas superiores consideradas como principal tipo de doença infecciosa em adultos.⁹⁵ Logo, torna-se interessante o conhecimento do perfil superantigênico do *S. aureus* em nível populacional visto seu potencial tanto como agente causador quanto como protagonista no agravamento de doenças.

Apresentando também um percentual relevante, encontrou-se as hemolisinas alfa e delta (89,7% e 93,3%) e o gene *icaD* (95,5%). Essas hemolisinas estafilocócicas codificadas pelos

genes (*hla* e *hld*), consistentemente identificados em nosso estudo, representam uma classe de fenótipos de virulência que permite ao *S. aureus* escapar do sistema imune do hospedeiro. A alfa-hemolisina cria poros na membrana alvo e a hemolisina delta permeabiliza a membrana, de modo que ambas atuam sinergicamente na lise dos eritrócitos e na agressão a uma grande variedade de células e organelas.⁹⁶ Elas contribuem diretamente para a injúria do endotélio e o escape da bactéria da destruição por leucócitos, estando ligadas a quadros de infecções sistêmicas.^{97, 98, 99} Em modelos experimentais, a alfa hemolisina tem sido identificada como um forte indutor de injúria pulmonar, além de induzir reações inflamatórias nos olhos, pele e abdômen quando injetada em roedores.¹⁰⁰ De acordo com Prince et al¹⁰¹ a *hla* também é capaz de levar à morte celular aberrante de eosinófilos *in vitro*, aumentando a lesão dos tecidos em doenças alérgicas.

Embora a presença do gene *icaD* tenha sido maciça, sabe-se que a formação do biofilme exige a presença do *operon icaADBC*, ou pelo menos o gene *icaA*, que codifica a enzima N-acetil-transferase responsável pela síntese da PIA (principal componente do biofilme), junto à co-expressão do gene *icaD* que aumenta a atividade dessa enzima. De acordo com Diamond-Hernández et al,¹⁹ isolados de carreadores saudáveis são menos propensos a produzirem biofilme do que isolados invasivos, fato que possivelmente explica os atuais achados.

O potencial patogênico do *Staphylococcus aureus* está provavelmente associado a diversos fenótipos de virulência que por sua vez, resultam em efeitos nocivos ao hospedeiro. Tal fato vem reforçar a importância dos resultados aqui mencionados.¹⁵ Estudos prévios encontrados abordando essa temática revelaram taxas similares em relação à distribuição dos genes de virulência em isolados de carreadores sadios de *S. aureus* e MRSA. Lozano et al⁴⁹, em pesquisa realizada na Espanha, identificou uma prevalência comumente representativa do gene *tst* com diferentes combinações de genes de enterotoxinas encontrados em isolados de *S. aureus*.⁴⁹ Em uma perspectiva diferente, o estudo de Lim et al¹⁰² avaliou o perfil de virulência durante o período de 2003 a 2008 em isolados de MRSA adquiridos no hospital, referindo-se a um crescente aumento no percentual dos genes codificantes das enterotoxinas A, C e do gene *icaD* relacionado a produção de biofilme.¹⁰² Um trabalho comparativo entre cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus* provenientes da Austrália, Hungria e Macedônia mostrou que a hemolisina alfa esteve presente em 86 e 94% de cepas de MSSA e MRSA. Em sequência, a hemolisina delta obteve 98 e 96%, contra 2,3% de PVL na Áustria, sendo que nenhuma das amostras era MRSA, dados que vão de encontro com os resultados anteriormente referidos.⁹⁷

Quanto à clonalidade dos isolados, a análise por PFGE permitiu identificar neste estudo 11 *clusters* (A-L) bem definidos circulantes na comunidade. Desses, três clones majoritários destacaram-se por concentrar maior número de isolados carreando genes de virulência e

resistência. Em tipagem por PFGE similar realizada na China com isolados de estudantes de medicina, 25 *clusters* circulantes foram descritos com 25 tipos de sequências, atribuídas em 16 complexos clonais.¹⁰² Em contrapartida, Sauer et al¹⁰³ identificaram 6 *clusters* em análise de isolados de origem hospitalar, assim como Udo e Sarkhoo¹⁰⁴ encontraram 4 grupos clonais em ambiente de mesma origem.

Embora o índice de cepas resistentes no presente estudo não tenha sido superior ao reportado na literatura mundial e sim concernente ao que se tem encontrado em outros estudos de base populacional realizados em outros países, torna-se relevante ressaltar que o *cluster* E reuniu o maior número de isolados de CA-MRSA, que por sua vez agruparam com um número consistente de cepas sensíveis. Partindo dessa premissa, resgata-se a hipótese do surgimento de estirpes resistentes de *S. aureus* a partir de cepas sensíveis¹⁰⁵ e evidencia-se a presença de um *cluster* de CA-MRSA bem sucedido e em disseminação no município. Acredita-se que as cepas de CA-MRSA apresentem um poder disseminatório superior em relação às cepas de origem hospitalar, o quê se explica pelo fato de albergarem um SCCmec menor, que lhe garantem maior mobilidade e adaptabilidade.¹⁵

Um resultado ainda não descrito, encontrado no atual estudo foi a caracterização de fatores epidemiológicos de portadores de *S. aureus* que estivessem relacionados à presença de genes de virulência específicos. Supõe-se que eles devam ser vistos a partir de uma perspectiva ecológica.¹⁰⁶ e, para tanto, é necessário lembrar que 32,5 % dos sujeitos do estudo eram portadores sadios de *S. aureus*. Igualmente, vale ressaltar que fatores relacionados à ocorrência da colonização podem ser distintos. Logo, requisitos em termos de presença de fatores de virulência são provavelmente superiores para indivíduos sem fatores de risco clássicos para a colonização.

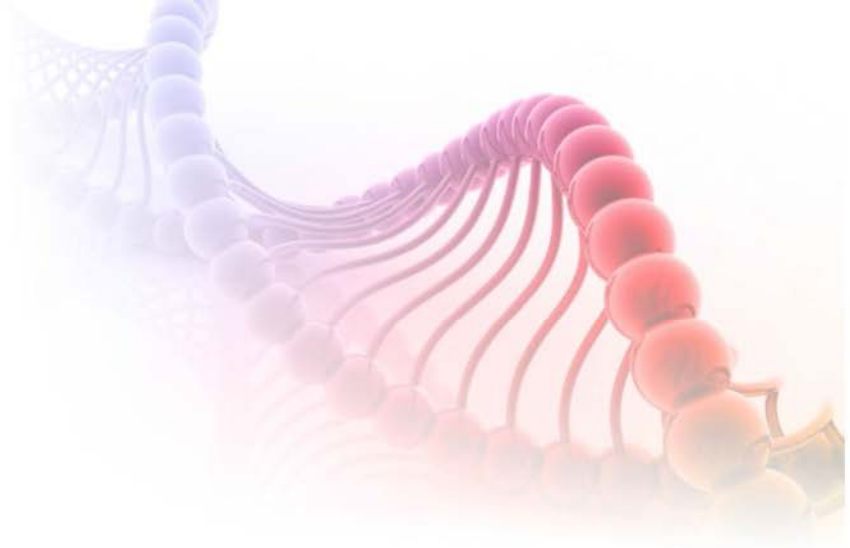
Por outro lado, entre aqueles que são mais propensos a serem colonizados, supõe-se que a presença dos genes de virulência seja menos necessária, fato que possivelmente explica a associação negativa encontrada na análise multivariada, entre o fator de risco Diabetes Mellitus e a presença dos genes de virulência. Sabe-se que o Diabetes Mellitus é uma doença crônica comum e representa um dos fatores de risco mais significativos para colonização por *S. aureus* e MRSA, predispondo o surgimento de infecções e estando associada a taxas expressivas de morbidade e mortalidade.^{107,108} Uma vez que um indivíduo portador do Diabetes, adulto ou criança, está sujeito a uma série de manifestações clínicas da doença incluindo infecções de pele e tecidos moles, trato respiratório, urinário, entre outros, somada às perturbações na atividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleares que se encontra reduzida em decorrência do índice elevado de glicose no sangue, acredita-se que as estirpes de *S. aureus* não precisem de vantagem

ecológica (presença de genes de virulência) para estabelecer a colonização, ou até mesmo a infecção, no referido indivíduo.^{107,108}

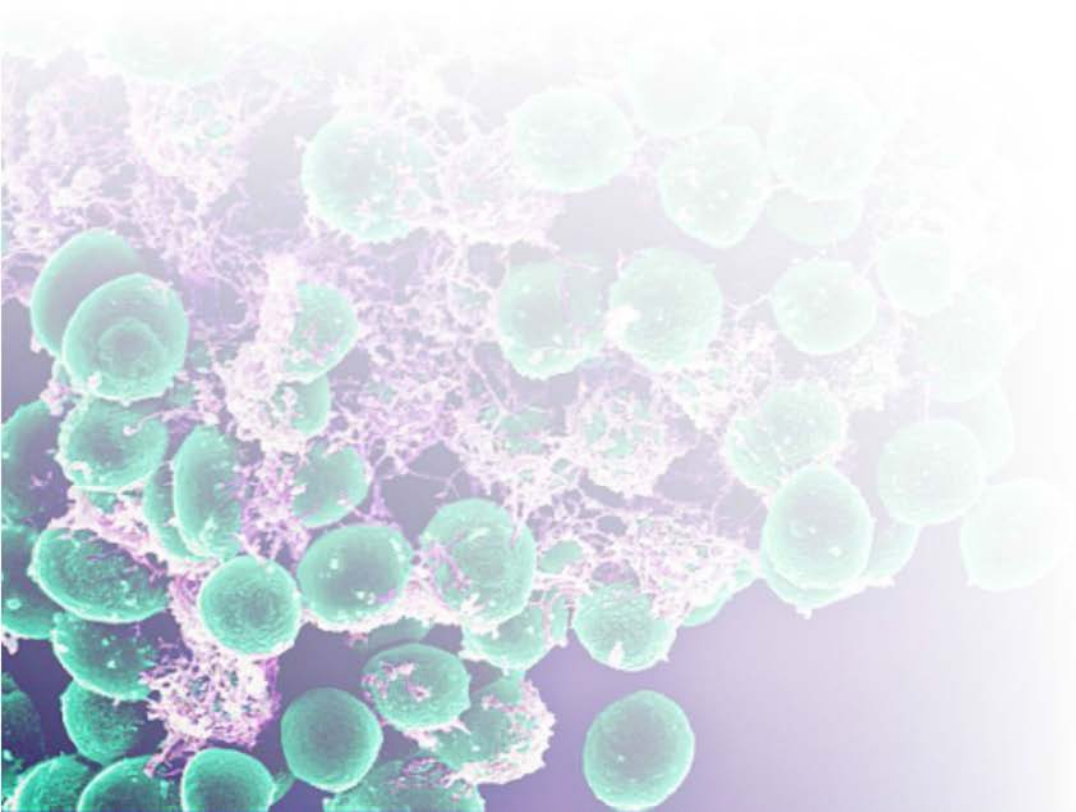
O fator mencionado representa um preditor bem definido para colonização por *S. aureus*.^{46,107,108} Para indivíduos com esse fator de risco, mesmo em isolados menos virulentos, o sucesso na colonização poderia ser obtido.

Quando realizada a análise para verificar a frequência dos genes de virulência entre sujeitos portadores e não-portadores do Diabetes Mellitus, pode-se observar claramente uma presença superior dos fatores de virulência naqueles que não eram portadores da doença. Assim, a presença dos fenótipos de virulência foi menos provável em tais isolados do que em cepas de outros sujeitos nos quais os genes de virulência poderiam conferir vantagem ecológica.

Estes achados trazem luz acerca de algumas questões epidemiologicamente importantes em relação não só à colonização, mas também à distribuição clonal, ao perfil de virulência e a fatores de risco vinculados à aquisição de cepas de *Staphylococcus aureus* albergando genes de virulência na população hígida do município de Botucatu. Estes representam, portanto, resultados pioneiros de inquérito de base populacional descritos no Brasil até o presente momento.



8. Conclusão



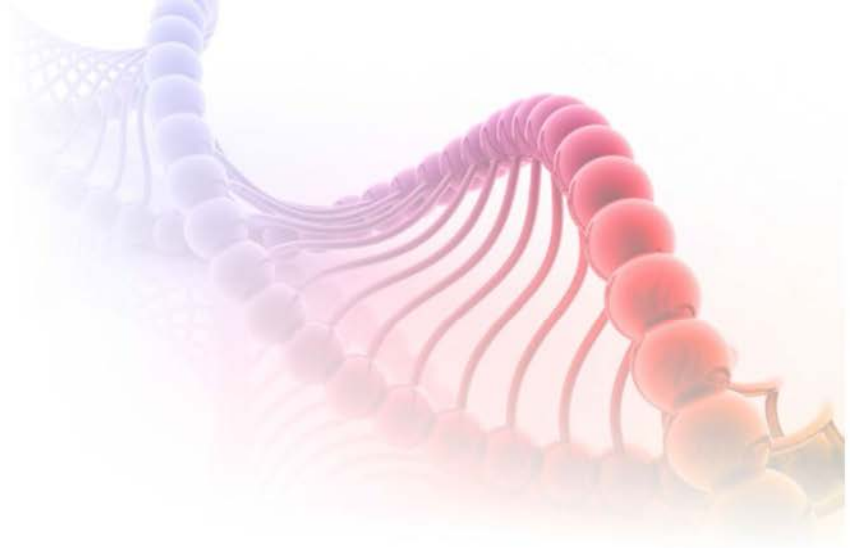
8. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo revelou uma prevalência significativa e variada de genes de virulência entre cepas de portadores assintomáticos de *S. aureus*. Essa distribuição ocorreu de forma heterogênea, exibindo uma predisposição maior para indivíduos sem os fatores de risco tradicionais para o carreamento de *S. aureus*.

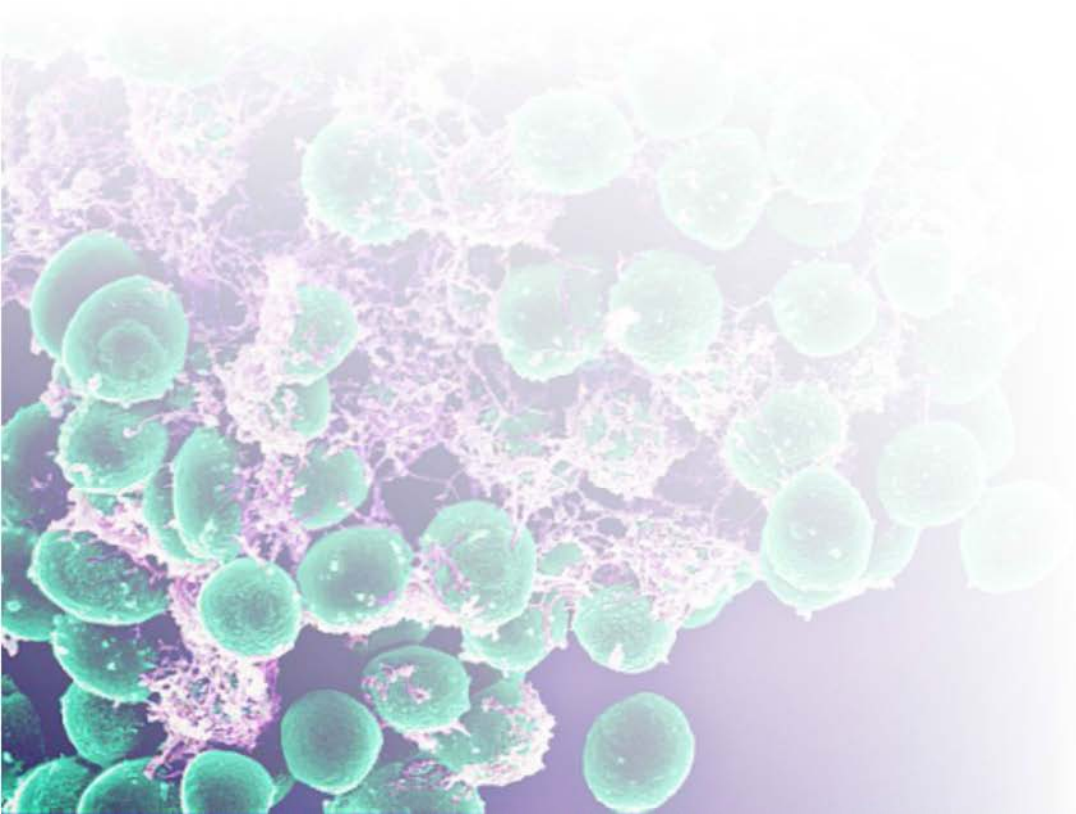
A extensa distribuição dos genes de virulência entre os clones amplamente difundidos na comunidade estudada sugere não apenas importância clínica como também epidemiológica, representando um ponto de partida para pesquisas futuras.

Constatou-se que as cepas de MRSA encontradas foram predominantemente SCCmec IV, fazendo juz ao ambiente de estudo. Foi possível notar que no município de Botucatu ainda não existem evidências da disseminação de isolados de HA-MRSA em meio aos indivíduos hígidos da comunidade, embora a cidade acomode um hospital de grande porte com mais de 400 leitos ativos.

Por fim, descrevemos que a existência desses *clusters* bem definidos e espargidos por regiões distintas do município trás um alerta no que diz respeito ao melhor direcionamento para a implantação de novas medidas de prevenção e controle da disseminação de infecções.



9. Referências Bibliográficas



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malachowa N, Kobayashi SD, DeLeo F. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and athletes. *Physician Sportsmed*. 2012; 40(2):1-8.
2. Silva ECBF, Samico TM, Cardoso RR, Rabelo MA, Bezerra-Neto AM et al. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. *Rev Esc Enferm USP*. 2012; 46(1):132-137.
3. Smith TC, Forshey BM, Hanson BM, Wardyn SE, Moritz ED. Molecular and epidemiologic predictors of *Staphylococcus aureus* colonization site in a population with limited nosocomial exposure. *Am J Infect Cont*. 2012; XXX:1-5.
4. Edwards AM, Massey RC, Clarke SR. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol Oral Microb*. 2012; 27: 1-10.
5. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Acesso em: 29 jul 2012. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
6. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *J Patho*. 2011; 1:1-13.
7. Murray PM, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical microbiology*, 6th Edition. Mosby, 2009.
8. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996; 17: 47-52.
9. Chen CJ, Hsu KH, Lin TY, Hwang KP, Chen PY, Huang YC. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:131-137.
10. Jarvis WR, Jarvis AA, Chin RY. National prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at United States health care facilities 2010. *Am J Infect Cont*. 2012; 40:194-200.
11. Lo WT, Wang CC, Lin WJ, Wang SR, Teng CS, Huang CF, Chen SJ. Changes in the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004-2009. *PLoS ONE*. 2010; 5:1-10.
12. Kluytmans J, Van-Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:505–520.
13. Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog*. 2011; 7:1-10.

14. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5:751–62.
15. Tong SYC, Chen LF, Fowler-Jr VG. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol*. 2012; 34:185-200.
16. Shambat S, Nadig S, Prabhakara S, Bes M, Etienne J, Arakere G. Clonal complexes and virulence factors of *Staphylococcus aureus* from several cities in India. *BMC Microbiol*. 2012; 12(64): 1-20.
17. Szczuka E, Urbńska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol*. 2012; 1:1-6.
18. Atshan SS, Shamsudim MN, Lung LTT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 1:1-7.
19. Diamond-Hernández B, Solórzano-Santos FS, Leños-Miranda BL, Peregrino –Bejarano LP, Miranda-Novales G. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infect Dis*. 2010; 10(68):1-6.
20. Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Aung TS, Mya S et al. Virulence factors and genetic characteristics of Methicillin-Resistant and – Susceptible *Staphylococcus aureus* isolates in Myanmar. *Microb Drug Resist*. 2011; 17(4):525-535.
21. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J*. 2005; 35:S106-19.
22. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes V. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*. 2010; 2:2177-2197.
23. McCulloch JA. Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2006.
24. Robinson DA, Monk AB, Cooper JE, Feil EJ, Enright MC. Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005; 187(24):8312-8321.

25. Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. Evidence for *icaADBC*-Independent biofilm development mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43:1973-1976.
26. Li M, Du X, Villaruz A, Diep BA, Wang D et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. Nat Med. 2012; 18(5):816-819.
27. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomic era. J Clin Invest. 2009; 119:2464-2474.
28. Yao D, Yu F, Qin Z, Chen C, He S, Chen Z et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). BMC Infect Dis. 2010; 10:133-138.
29. Tavares DA, Leão RS, Miragaia M, Lencastre H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing health young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. BMC Infect Dis. 2010; 10:110-118.
30. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001; 7:178-182.
31. Bassetti M, Nicco E, Mikulka M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? Int J Antimicrob Agents. 2009; 34:S15-S19.
32. Cooke FJ, Brown NM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Br Med Bull. 2010; 94: 215-227.
33. Daurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggemann CA, Stobbering EE. The molecular evolution of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13:222–235.
34. Ito T, Hiramatsu K, Oliveira D, Lencastre H, Zhang K, Skov R et al. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG – SCC). Acesso em 30 jul 2012. Disponível em: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html
35. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol. 2008; 16:361-369.
36. Gosbell IB. Epidemiology, clinical features and management of infections due to community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Intern Med J. 2005; 35:S120-S135.
37. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and

- heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010; 23:99-139.
38. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:4580-4587.
39. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States. Morb Mortal. 2002.Wkly. Rep. 51:565–567.
40. Klevens RM, Morrison M, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298:1763-1771.
41. Olsen K, Sangvik M, Simonsen GS, Sollid JUE, Sundsfjord A, Thune I et al. Prevalence and population structure of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers in a general population. The Tromsø Staph and Skin Study. Epidemiol Infect. 2012; 1:1-10.
42. Hayward A, Knott F, Petersen I, Livermore DM, Duckworth G, Islam A et al. Increasing hospitalizations and general practice prescriptions for community-onset *Staphylococcal* disease, England. Emerg Infect Dis. 2008; 14:720-726.
43. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis. 2006; 193:172-179.
44. Graham PL 3rd, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. Ann Intern Med. 2006; 144: 318-325.
45. Mainous III AG, Hueston WJ, Everett CJ, Diaz VA. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. Ann Fam Med. 2006; 4:132-137.
46. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. J Infect Dis. 2008; 197: 1226-1234.
47. Furuya EY, Cook HA, Lee MH, Miller M, Larson E, Hyman S et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence: how common is it? A methodological comparison of prevalence ascertainment. Am J Infect Control. 2007; 35: 359-66.
48. Abudu L, Blair I, Fraise A, Cheng KK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a community-based prevalence survey. Epidemiol Infect. 2001; 126: 351-356.

49. Lozano C, Gómez-Sanz, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *IJMM*. 2011; 301:500-505.
50. Lu PL, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 132-139.
51. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C et al. 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.
52. Santos HB, Machado DP, Camey SA, Kuchenbecker RS, Barth AL, Wagner MB. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2012; 10:(328) 1-7.
53. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 90-98.
54. 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; 5: 163-70.
55. Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010; 14: 71-6.
56. Nascimento-Carvalho CM, Lyra TG, Alves NN, Caldas RM, Barberino MG. Resistance to methicillin and other antimicrobials among community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains in a pediatric teaching hospital in Salvador, Northeast Brazil. *Microb Drug Resist*. 2008; 14:129-31.
57. Scribel LV, Scribel MV, Bassani E, Barth AL, Zavascki AP. Lack of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among patients at a primary-healthcare unit in Porto Alegre, Brazil. *Rev. Inst Med Trop*. 2011; 53(4):197-199.
58. Lamaro-Cardoso J, Lencastre H, Kipnis A, Pimenta FC, Oliveira LSC, Oliveira RM et al. Molecular epidemiology and risk Factors for nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(12): 3991–3997.

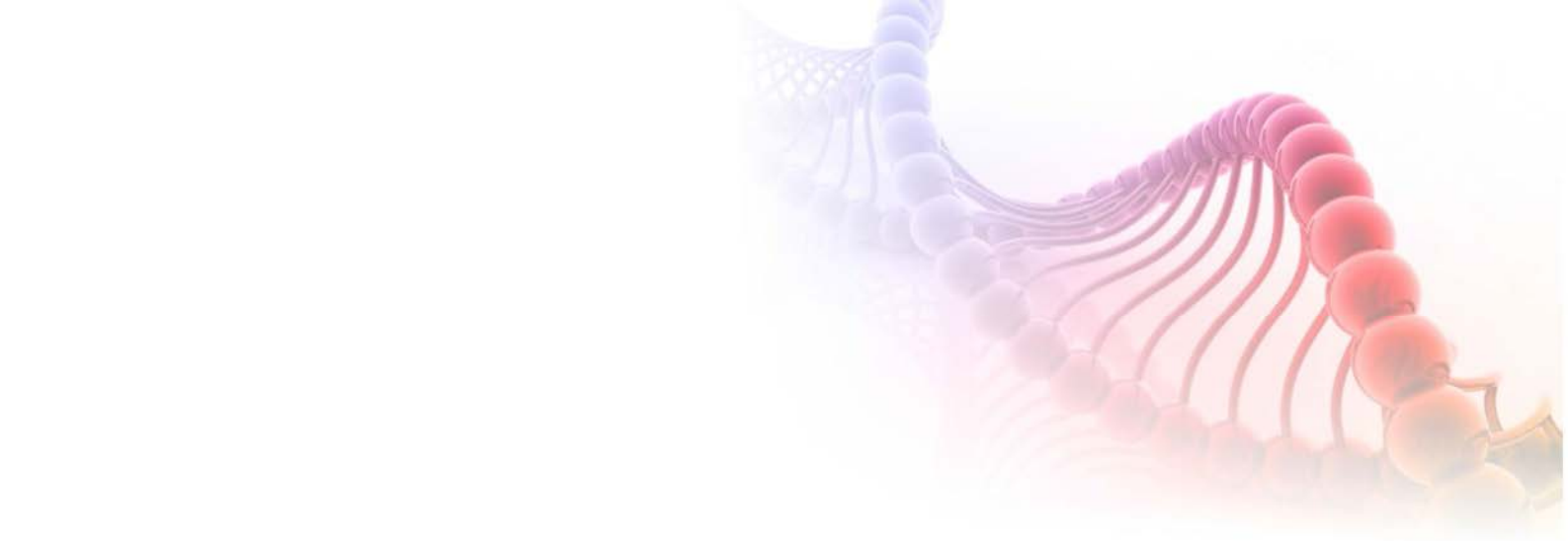
-
59. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005; 43:1985-1988.
60. Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R et al. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59: 339-345.
61. Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, dos Santos LC, de Souza Conceição M et al. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65: 300-305.
62. 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: 213-216.
63. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010, município de Botucatu. Acesso em: 28 dez 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=350750>
64. Comissão de Controle de Infecção Relacionada a Assistência em Saúde. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB Unesp. Acesso em 28 dez 2012. Disponível em: <http://www.hc.fmb.unesp.br>
65. Cesar CLG, Carandina L, Alves MCP, Barros MBA e Goldbaum M. Saúde e condição de vida em São Paulo. Inquérito multicêntrico de saúde no estado de São Paulo – ISA/SP. São Paulo: USP/FSP, 2005.
66. Ross, TD. Accurate confidence intervals for binomial proportion and Poisson rate estimation. Comput Biol Med. 2003; 33:509–531.
67. Konemman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5º ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
68. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3332-3338.

69. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1998; 36(3): 618–623.
70. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition (M02-A10). CLSI, 2012.
71. 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.
72. Milheirício C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 3374-3377.
73. 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.
74. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. J Clin Microbiol. 2003; 41(11):5113-5120.
75. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991; 29: 426-30.
76. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Jr JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. Microbiol and Immunol. 2007; 51:381–390.
77. Johnsson D, Molling P, Stralin K, Soderquist B. Detection of Panton–Valentine Leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004; 10:884–889.
78. Marconi C, Cunha MLRS, Araujo Jr JP, Rugolo LMSS. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in *Staphylococcus spp*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2004; 11: 117-28.
79. Koning S, Van Belkum A, Snijders S, van Leeuwen W, Verbrugh H, Nouwen, J, Op't Veld M, van Suijlekom-Smith LW, van der Wouden JC, Verduin C. Severity of

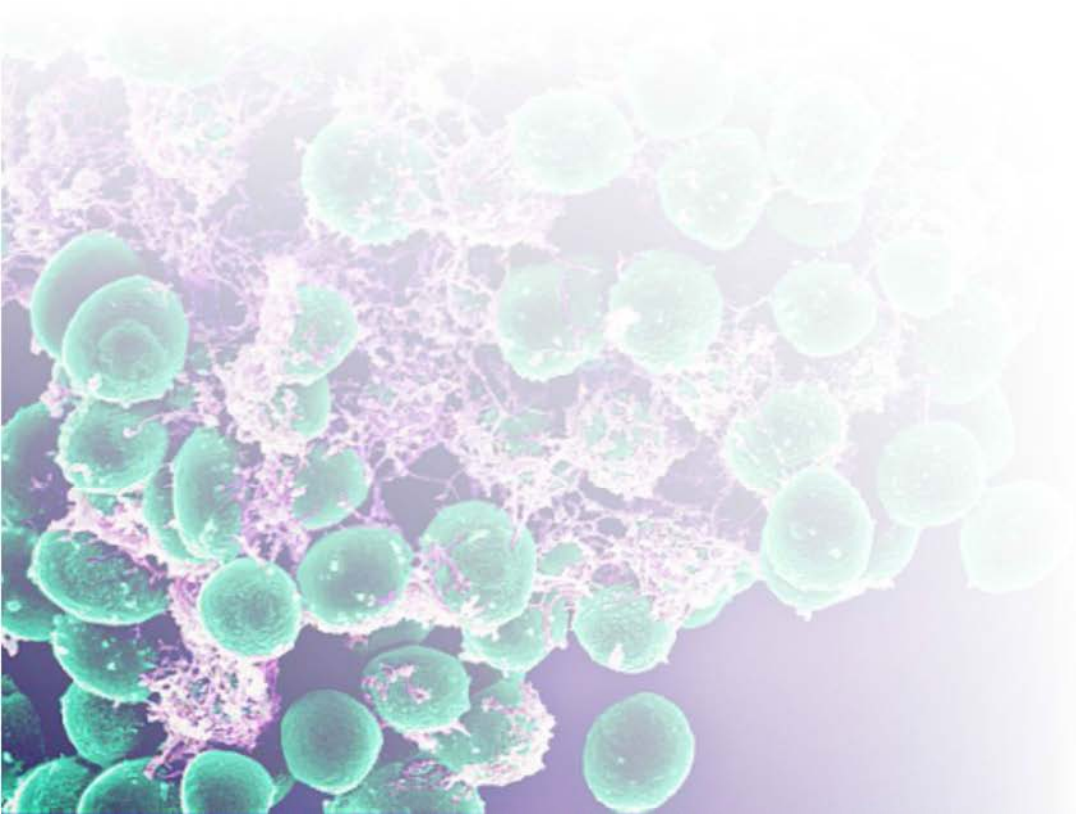
- nonbullous *Staphylococcus aureus* impetigo in children is associated with strains harboring genetic markers for exfoliative toxin B, Panton Valentine leukocidin, and the multidrug resistance plasmid psk41. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3017-3021.
80. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2151-6.
81. Coates T, Bax R, Coates A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 9-1.
82. Dalager-Pedersen M, Sogaard M, Schonheyder HC. *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in primary healthcare in Denmark: a 12-year population-based study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30:951-956.
83. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. J Clin Microbiol. 2010; 48(5): 1701–1705.
84. Pereira EPL. Caracterização da Resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de feridas de pacientes atendidos em unidades básicas de saúde da cidade de Botucatu, SP[dissertação]. Botucatu/SP: Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp; 2011.
85. Bonesso MF. Determinação da virulência e da resistência antimicrobiana e *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.
86. Brown ML, O'Hara P, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA et al. Prevalence and sequence variation of Panton-Valentine Leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States. J Clin Microbiol. 2012; 50(1):86-90.
87. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Diseases. 2003; 9(8):978-984.
88. Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. Ann Intensive Care. 2011; 1:(52) 1-7.

-
89. Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 101–104.
 90. Chen F, Huang I, Wang C, Chen P, Wang H, Lai J et al. *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. J Clin Microbiol. 2012; 50(5): 1679-1683.
 91. Ferry T, Thomas D, Genestier AL, Bes M, Lina G, Vandenesch F et al. Clin Infect Dis. 2005; 41:771–777.
 92. Karauzum H, Chen G, Abaandou L, Mahmoudieh M, Boroun AR, Shulenin S et al. Synthetic human monoclonal antibodies towards staphylococcal enterotoxin B (SEB) protective against toxic shock syndrome. J Biol Chem. 2012; 287: 25203-25215.
 93. Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. FCIMB. 2012; 2(52): 1-11.
 94. Brosnahan AJ, Schlievert PM. Gram-positive bacterial superantigen outside-in signaling causes toxic shock syndrome. FEBS Journal. 2011; 278:4649–4667.
 95. Garibaldi RA. Epidemiology of community acquired respiratory tract infections in adults: Incidence, etiology, and impact. AJOM. 1985; 78(6): 32–37.
 96. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjaud JM, Héchard Y. δ -hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. Peptides. 2009; 30:817–823.
 97. Kocsis E, Lagler H, Pesti N, Stich K, Kristóf K, Nagy K et al. Comparison of Austrian, Hungarian and Macedonian methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains in relation to prevalence of cytotoxin genes. Microb Pathog. 2009; 46:328-336.
 98. Santamaria B, Reyero A, Ortiz A. The journey from peritoneal dialysis to diabetic nephropathy: 3.4-DGE. Unidad de Dialisis. Fundacion Jimenez Diaz, Universidad Autonoma de Madrid y Grupo de Estudios Peritoneales de Madrid del Instituto Reina Sofia de Investigaciones Nefrológicas. 2007.
 99. Powers ME, Kim HK, Wang Y, Wanderburg J. ADAM10 mediates vascular injury induced by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin. JID. 2012; 206:352–356.
 100. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Wardenburg JB, McElvania-TeKippe E et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. PLoS ONE. 2009; 4(10):1-11.

101. Prince LR, Graham KJ, Conolly J, Anwar S, Ridley R, Sabroe I et al. *Staphylococcus aureus* induces eosinophil cell death mediated by α -hemolysin. PLoS ONE. 2012; 7(2): 1-11.
102. Lim KT, Hanifah YA, Yusof M, Thong KL. Investigation of toxin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Trop. Biomed. 2012; 29(2): 212–219.
103. Sauer P, Síla J, Stosová T, Vecerová R, Hejnar P, Vagnerová I et al. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. J Med Microbiol. 2008; 57:403-410.
104. Udo EE, Sarkhoo E. The dissemination of ST80-SCCmec-IV community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone in Kuwait hospitals. ACMA. 2010; 9(31): 1-7.
105. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(12):3926-3934.
106. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Loham AJ, Tong P et al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. PLoS Pathog. 2012; 8(4):1-15.
107. Kutlu SS, Cevahir N, Akalin S, Akin F, Caylak SD, Bastemir M et al. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a diabetic outpatient population: a prospective cohort study. Am J Infect Cont. 2012; 40: 365-368.
108. Krentz AJ. Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes mellitus. Diabetic Med. 2000; 17: 487-491.



10. Anexos



10. ANEXOS

Anexo A– Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

I – TCLE para adultos.

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa chamado “Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular.” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessário.

Texto:

Várias pessoas carregam no nariz uma bactéria chamada “estafilococo”. Normalmente, essa bactéria não causa nenhum mal. Mas algumas têm um “estafilococo” diferente, que é resistente a vários antibióticos. Essas pessoas têm maior risco de adquirir infecções de pele, pneumonias e outras. O objetivo da nossa pesquisa é identificar as pessoas que carregam o “estafilococo”, principalmente em sua forma resistente. Para isso, precisamos colher secreção das suas narinas e realizar exames. A coleta da secreção se faz introduzindo uma espécie de “cotonete” em cada narina. Isso é feito de forma suave e não causa dor.

Na secreção colhida, serão feitos exames para identificar se o “estafilococo” está presente e se ele é da forma resistente. Também serão realizados exames para identificar a tendência dessa bactéria de causar doença. Você ficará sabendo do resultado pessoalmente através dos pesquisadores, que voltarão a visitar sua casa. Caso você tenha o “estafilococo” resistente ou venha apresentando várias infecções de pele, será encaminhado para atendimento no Hospital das Clínicas da Unesp. Lá, nós forneceremos uma “pomada” nasal e um sabão líquido com antisséptico para eliminação do “estafilococo”. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, possibilitando medidas de prevenção e tratamento de infecções.

Precisaremos também que você responda a um questionário com informações pessoais, que será aplicado pelo pesquisador. Você levará cerca de 10 minutos para responder a esse questionário. Caso você tenha sido internado no hospital das clínicas da UNESP no último ano, solicitamos sua autorização para coletar dados do seu prontuário.

É importante você saber que em nenhum momento será divulgado seu nome ou qualquer informação que permita sua identificação. Além disso, você poderá retirar sua participação da pesquisa quando quiser, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores, e, se não se sentir atendido, com a Chefe do Departamento de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu. Quaisquer outras dúvidas podem ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Fone: 14-3811 6143).

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

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

Ass.: _____ Nome: _____

Pesquisadores:

Fabiana Venegas Pires – Fone: (14) 9151 1577

Carlos Magno C. B. Fortaleza – Fone (14) 9601 0996

Lígia Maria Abraão – Fone: (14) 9115 6367

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha – Fone (14) 3811 62 40 Ramal 231

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N - Anexo vermelho – 3º Andar.

Fone: (14) 3811 6212

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu

Fone: (14) 3811 6143

II – TCLE para menores de 18 anos.

Estamos convidando seu[sua] filho[a] (ou dependente legal) a participar do projeto de pesquisa chamado “Carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* na população de Botucatu, São Paulo: prevalência, fatores de risco, resistência a antimicrobianos e epidemiologia molecular.” Leia atentamente o texto abaixo e faça qualquer pergunta que achar necessário.

Texto:

Várias pessoas carregam no nariz uma bactéria chamada “estafilococo”. Normalmente, essa bactéria não causa nenhum mal. Mas algumas têm um “estafilococo” diferente, que é resistente a vários antibióticos. Essas pessoas têm maior risco de adquirir infecções de pele, pneumonias e outras. O objetivo da nossa pesquisa é identificar as pessoas que carregam o “estafilococo”, principalmente em sua forma resistente. Para isso, precisamos colher secreção das narinas do[a] seu[sua] filho[a] (ou dependente) e realizar exames. A coleta da secreção se faz introduzindo uma espécie de “cotonete” em cada narina. Isso é feito de forma suave e não causa dor.

Na secreção colhida, serão feitos exames para identificar se o “estafilococo” está presente e se ele é da forma resistente. Também serão realizados exames para identificar a tendência dessa bactéria de causar doença. Você ficará sabendo do resultado pessoalmente através dos pesquisadores, que voltarão a visitar sua casa. Caso seu[sua] filho[a] (ou dependente) tenha o “estafilococo” resistente ou venha apresentando várias infecções de pele, será encaminhado para atendimento no Hospital das Clínicas da Unesp. Lá, nós forneceremos uma “pomada” nasal e um sabão líquido com antisséptico para eliminação do “estafilococo”. Além disso, participando da pesquisa, você irá colaborar com o conhecimento sobre essa bactéria, possibilitando medidas de prevenção e tratamento de infecções.

Precisaremos também que você responda a um questionário de informações sobre seu[sua] filho[a] ou dependente, que será aplicado pelo pesquisador. Você levará cerca de 10 minutos para responder ao questionário. Caso seu filho [sua filha] ou dependente tenha sido internado no hospital das clínicas da UNESP no último ano, solicitamos sua autorização para coletar dados do prontuário.

É importante você saber que em nenhum momento será divulgado seu nome ou de seu filho (ou dependente), e nem qualquer informação que permita sua identificação. Além disso, você poderá retirar a participação do[a] seu[sua] filho[a] (ou dependente) da pesquisa quando quiser, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores, e, se não se sentir atendido, com a Chefe do Departamento de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu. Quaisquer outras dúvidas podem ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Fone: 14-3811 6143).

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

Declaro que li e estou de acordo com a participação do meu filho [da minha filha] (e/ou dependente) no projeto de pesquisa.

Ass.: _____

Nome: _____

Assinatura do[a] menor (se tiver 12 anos ou mais):

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

Ass.: _____ Nome: _____

Pesquisadores:

Fabiana Venegas Pires – Fone: (14) 9151 1577

Carlos Magno C. B. Fortaleza – Fone (14) 9601 0996

Lígia Maria Abraão – Fone: (14) 9115 6367

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha – Fone (14) 3811 62 40 Ramal 231

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N - Anexo vermelho – 3º Andar.

Fone: (14) 3811 6212

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu

Fone: (14) 3811 6143

Anexo B – Questionário aplicado aos sujeitos da pesquisa no momento da coleta dos *swabs*.**Dados gerais:**

Nome: _____ Data Nascimento: __/__/__ Idade: _____ Gênero: _____
Profissão: _____

Escolaridade: _____ Renda familiar aproximada: _____

Se estudante (inclusive universitário):

Escola: _____ Turno: _____ Pública? () S () N

Se trabalha:

Local de trabalho: _____

Cargo ou Função: _____ Regime (h/semana): _____ Turno: _____

Esportes:

Pratica esportes? () S () N Qual(is)?: _____

Com que frequência: _____

Uso de adornos:

() Brincos. Há quanto tempo _____

() Piercings. Local: _____. Há quanto tempo: _____

() Tatuagem. Local: _____. Há quanto tempo: _____

() Outros: _____. Há quanto tempo _____

Tem alguma dessas doenças:

() Doença cardíaca. Qual? _____.

() Doença pulmonar. Qual? _____.

() Doença renal. Qual? _____.

() Doença hepática. Qual? _____.

() Doença neurológica. Qual? _____.

- () Diabetes mellitus. Usa insulina? () S () N.
- () Neoplasia. Qual? _____.
- () Aids.
- () Úlceras crônicas. Onde? _____.
- () Outra(s) doença(s) crônica(s): _____.

No último ano, apresentou:

- () Infecções de pele. Há quanto tempo? _____
- () Pneumonia. Há quanto tempo? _____
- () Outra infecção. Qual? _____. Há quanto tempo? _____

Uso de medicação no último ano:

- () Antibiótico(s). Qual(is)? _____. Quando? _____
- () Esteróide. Qual? _____. Quando? _____
- () Outra(s) medicação(ões). Qual(is)?: _____
_____. Quando? _____

Internação e outros procedimentos no último ano:

- () Internação. HC-UNESP? () S () N. Quando? _____

Prontuário: _____

- () Cirurgia. Qual? _____. Quando? _____
- () Hemodiálise. Desde Quando? _____
- () Outro procedimento. Qual? _____. Quando? _____
- () Consulta ambulatorial. Quando? _____

Por que: _____

Alcool e outras substâncias:

- () Etilismo: () atual; () passado.

Desde Quando? _____ Bebida, doses/semana: _____

() Tabagismo. () atual; () passado.

Desde Quando? _____ Cigarros-dia: _____

() Droga(s) inalatória(s). Qual(is)?: _____

() Droga(s) injetável(s). Qual(is)?: _____

Instituições fechadas que freqüentou no último ano:

() Creche. Qual? _____

() Serviço militar

() Cadeia ou Presídio. Onde? _____

() Casa de repouso. Qual? _____

() Outra. Qual? _____

Outras observações do sujeito: _____

Anexo C. Aprovação do Comitê de Ética



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, 04 de julho de 2011.

Of. 260/11-CEP

Ilustríssima Senhora

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha

Departamento de Micro/Imuno do

Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Dr^a Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - **(Protocolo CEP 3905-2011) "Detecção dos genes de virulência e identificação do perfil clonal de isolados de Staphylococcus aureus colonizantes de nasofaringe obtidos em estudo de base populacional no município de Botucatu-SP"**, a ser conduzido por Ligia Maria Abraão, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pelo Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza e colaboração de Fabiana Venegas Pires e Luana Carandina, recebeu do relator parecer favorável, aprovado **com sugestão** em reunião do CEP de **04 de Julho de 2011**.

SUGESTÃO: Após a conclusão deste projeto que os dados sejam repassados ao SUS.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.