

Jackson Eliezer Neves Batalha

IMPORTÂNCIA DA VIRULÊNCIA NAS LINHAGENS DE *Staphylococcus* spp. EM PORTADORES E NO RISCO DE PERITONITES EM DIÁLISE PERITONEAL AMBULATORIAL

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Jacqueline Teixeira Caramori

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

BOTCATU-SP

2013

DEDICATÓRIA

DEDICO ESPECIALMENTE ESTA TESE:

Aos meus pais Antonio Batalha (em memória) e Maria Aparecida Neves Batalha que de forma efetiva, contribuíram com todas as condições possíveis e necessárias para a conclusão de mais uma importante etapa para meu desenvolvimento, além do extremo amor.

À minha companheira de vida Fernanda Campagner, pela dedicação, companheirismo, amor, carinho, amparo, e estímulo para vencer as adversidades ocorridas pelo caminho.

A meu mestre de filosofia da vida, Presidente da SGI Dr. Daisaku Ikeda, por valorosas orientações rumo ao meu aprimoramento espiritual.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS:

À minha orientadora Prof. Dra. Jacqueline Teixeira Caramori, pela efetiva dedicação, paciência e persistência e considerações oportunas para aprimoramento como profissional e conclusão desta jornada.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha pela prestigiosa contribuição e preocupação para com o meu desenvolvimento profissional e desta pesquisa.

À Prof. Dra. Daniela Ponce e à Prof. Dra Adriana Polachini do Vale pelas valiosas considerações e sugestões na vigência do Exame Geral de Qualificação.

À Prof. Dra. Terue Sadatsune pela preocupação e empenho colaborativo para a conclusão desta pesquisa.

Ao Prof Dr. José Eduardo Corrente do Departamento de Estatística pelo precioso apoio e estimada atenção.

|

AGRADECIMENTOS:

Aos pacientes da Diálise Peritoneal pela colaboração para realização deste estudo.

À todos os profissionais e funcionários da Unidade de Diálise do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores, funcionários e todos os colegas do Departamento de Micro-Imunologia do Instituto de Biociências-Unesp-Botucatu pela colaboração e aprendizado técnico, carinho e atenção empreendida durante os anos de convivência.

.

Aos amigos e companheiros de Laboratório de Microbiologia do instituto de Biociências, Unesp-Botucatu, Danilo Flávio Moraes Riboli, Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues e Valéria Cataneli Pereira, pela estimável e efetiva contribuição nesta pesquisa.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório Clínico do HC-Unesp-Botucatu Adraino Martison Ferreira, Ana Lúcia da Silva Rosa, Claudia Prado, Eneida Benato Seabra Spinelli, Manoel Roque Tomaz, Marcos Antonio Bronzato Maria Angélica, Melissa Saleme, pela amizade, carinho e colaboração.

Dr Luis Shiguero Matsubara pela imprescindível oportunidade para conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Clínica Médica pela oportunidade da realização desta pós-graduação.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da FMB Botucatu-Unesp pela estimada atenção e ajuda durante todo caminho como Pós-graduando.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da clinica médica pela estimada atenção e auxilio durante toda minha passagem pelo departamento.

À todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais esta etapa.

EPÍGRAFE

“Ensinar as pessoas significa lubrificar as rodas para que as mesmas possam girar; ou fazer flutuar um navio para que o mesmo possa ser movimentado facilmente. Se o ensino é superior, a pessoa que o abraça é digna de respeito. Assim sendo, desprezar essa pessoa é o mesmo que desprezar o próprio ensino,..., isto é comparável a atitude de censurar uma criança, cujo ato é ao mesmo tempo uma censura aos pai,..., sofrer o que tiver que sofrer, desfrutar o que existe para ser desfrutado, considere tanto o sofrimento como a alegria como fatos da vida,..., assim como uma pequena planta deve enfrentar muitos obstáculos antes de se transformar numa árvore, nós precisamos experimentar muitas dificuldades no caminho da felicidade.”

NITIREN DAISHONIN

SUMÁRIO

	Páginas
1. Introdução	11
2. Objetivos	17
3. Casuística e Métodos	18
3.1. Casuística	18
3.2. Seleção da amostra microbiológica	18
3.3. Delineamento	19
3.4. Classificação dos pacientes quanto ao estado de portador de <i>Staphylococcus</i> spp.	20
3.5. Definição de peritonite	20
3.6. Definição da infecção do orifício de saída	20
3.7. Coleta, processamento e armazenamento do material clínico	20
3.8. Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas <i>in vitro</i>	22
3.9. Fatores de patogenicidade	23
3.10. Técnicas Genotípicas	26
3.11. Métodos Estatísticos	29
4. Resultados	30
4.1. Características da população estudada	30
4.2. Frequência dos pacientes quanto ao estado de portador de <i>Staphylococcus</i> spp.	30
4.3. Caracterização das espécies carregadas	31
4.4. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	31
4.5. Produção de fatores de patogenicidade	32
4.6. Características epidemiológicas e clínicas determinantes para o portador de <i>S. aureus</i>	35
4.7. Patogenicidade dos <i>S. aureus</i> carregados na fossa nasal	35
4.8. Influência epidemiológica e clínica dos pacientes portadores de <i>Staphylococcus</i> spp. no risco de infecções relacionadas à diálise peritoneal	36
4.9. Influência das características clínicas e epidemiológicas no tempo livre de infecções relacionadas à diálise peritoneal	36
4.10. Influência da patogenicidade dos <i>Staphylococcus</i> spp. carregados no risco de infecção relacionada à diálise peritoneal	37
4.11. Influência da patogenicidade da bactéria no tempo livre de infecção relacionada à diálise peritoneal	38
4.12. Associação entre produção de fatores de patogenicidade e ocorrência de infecção	28
4.13. Associação entre espécies <i>Staphylococcus</i> carregadas e ocorrência de infecção	39
4.14. Investigação de similaridade entre as linhagens isoladas (técnicas genotípicas)	40
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

Peritonites e infecções do orifício de saída do cateter de diálise representam as principais complicações infecciosas relacionadas à diálise peritoneal, frequentemente respondem pela falência deste método dialítico, portanto com importante impacto na morbidade e mortalidade dos pacientes. Existem associações entre o portador de *S. aureus* e aumento no risco de infecções nos pacientes tratados por diálise peritoneal. Entretanto, desconhecemos estudos que avaliaram a virulência de *Staphylococcus* spp. carregados. Fatores de virulência são descritos como responsáveis pelos sintomas e gravidade de diversas infecções causadas por *S. aureus*. Esses fatores incluem as hemolisinas α , β , γ e δ , lipases, lecitinases, proteases, toxina 1 da Síndrome do Choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (EES), desoxirribonuclease (DNase) e de desoxirribonuclease termoestável (TNase). Este estudo teve como objetivo avaliar se fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus* spp. e as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes podem influenciar na ocorrência de infecções relacionadas ao tratamento. Para tal, foram incluídos 32 pacientes tratados por diálise peritoneal na Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, avaliados primariamente quanto à colonização (culturas de coletas nasais e pele pericater, em três momentos distintos no período de 12 meses) e subsequentemente foram observados quanto ao risco para a ocorrência de infecções, acompanhados por até 36 meses confirmados com culturas do efluente peritoneal na ocorrência de peritonites e secreção da pele pericater na vigência de infecção de orifício de saída do cateter. As amostras de *Staphylococcus* spp. carregadas depois de devidamente identificadas, foram reavaliadas usando como critério de similaridade o método de susceptibilidade com técnica de difusão da droga em ágar (Método Kirby-Bauer), permitindo assim selecionar linhagens de sítios carregados, mas também dos sítios infectados e a isso acrescentar conhecimentos clínicos e microbiológicos no fator de risco do portador nasal para infecções relacionadas à diálise peritoneal. A associação entre a virulência e a ocorrência de infecção, foi estudada por modelos de regressão logística, para o tempo livre até a primeira infecção e para ocorrência das infecções. Para análise de similaridade

entre as cepas além do método utilizado foi UPGMA com distância Euclidiana. Nesta população encontrou-se que 50% dos pacientes foram portadores de *S. aureus* e 78,1% de *S. epidermidis*; pacientes de cor branca e portadores de diabetes melito conferiram maior chance de ser portador de *S. aureus*, 8,2 e 3,3 vezes respectivamente; ao passo que o avançar da idade e do tempo de diálise diminuíram a chance em 8,6% e 3,7% ao ano respectivamente. Para portadores de espécies de *Staphylococcus*, o *status* de portador de *S. aureus* aumentou o risco de infecção relacionada à diálise em 11 vezes; assim como as mulheres tiveram risco maior. Quanto ao tempo para primeira infecção a probabilidade de menor tempo livre foi para mulheres, enquanto que o avanço da idade implicou em diminuição do risco em 5,6% ao ano. Em consideração aos fatores microbiológicos, o estudo apontou que a resistência à oxacilina e a multirresistência foi significativamente superior para *S. epidermidis* do que *S. aureus*, *S. warneri* e outros coagulase negativos ($p < 0,05$). Quanto à produção enzimática, o perfil dos *Staphylococcus* para hemolisina α , hemolisina β , lecitinase, lipase, perfil toxigênico, assim como a produção de biofilme foi mais prevalente para *S. aureus*. Em análise multivariada a produção de fatores de patogenicidade das bactérias atuou como fator de risco para infecção, sugerimos que lecitinase e possivelmente o biofilme tem importante papel na ocorrência de infecções pelo mesmo agente carregado em fossas nasais.

ABSTRACT

Peritonitis and infections in the exit orifice of the dialysis catheter represent the main infectious complications related to peritoneal dialysis, and are often responsible for the failure in this dialysis method, therefore with a significant impact on morbidity and mortality of patients. There are associations between the carrier of *S. aureus* and increased risk of infection in peritoneal dialysis patients. However, studies that evaluated the virulence of *Staphylococcus* spp. carried are not aware. Virulence factors are described as responsible for the symptoms and severity of different infections caused by *S. aureus*. These factors include hemolysins α , β , γ and δ , lipases, lecithinases, proteases, toxin 1 in Toxic Shock Syndrome (TSST-1) and staphylococcal enterotoxins (SEs), deoxyribonuclease (DNase) and thermostable deoxyribonuclease (TNase). This study aimed to evaluate whether virulence factors produced by *Staphylococcus* spp. and the clinical and epidemiological characteristics of patients may influence the occurrence of infections related to the treatment. In order to do this, 32 patients treated by peritoneal dialysis at the Dialysis Unit of the University Hospital, Botucatu School of Medicine, UNESP, Brazil were included, evaluated primarily by the colonization (cultures collected from the nose and pericatheter skin, at three different times during 12 months) and subsequently were observed regarding the risk for the occurrence of infections, followed by at least 36 months confirmed with cultures from peritoneal effluent in the occurrence of peritonitis and secretion of the pericatheter skin in the occurrence of infection in the outlet orifice of the catheter. Samples of *Staphylococcus* spp. carriers after being properly identified, were reevaluated using similarity criteria from the method of susceptibility agar drug diffusion technique (Kirby-Bauer method), thus allowing strains selection of carried sites, but also infected sites and add to this clinical and microbiological knowledge in the risk factor of the nasal carrier infections related to peritoneal dialysis. The association between virulence and the occurrence of infection was studied by logistic regression models for the free time until the first infection and for the occurrence of infections. For analysis of similarity between the strains we also used the method UPGMA with Euclidean distance. In this population was found that 50% of

patients were carriers of *S. aureus* and 78.1% of *S. epidermidis*; caucasian patients and patients with diabetes mellitus conferred greater chance of being a carrier of *S. aureus*, 8.2 and 3.3 times respectively, while increasing age and duration of dialysis decreased the chance in 8.6% and 3.7% per year respectively. To the *Staphylococcus* species carriers, the carrier status of *S. aureus* increased the risk of infection related to dialysis in 11 times; just as the women had a greater risk. Regarding the time for the first infection, the probability of less free time was for women, while advancing age resulted in decreased risk by 5.6% per year. In consideration of microbiological factors, the study found that oxacillin resistance and multidrug resistance was significantly higher for *S. epidermidis* than *S. aureus*, *S. warneri* and other coagulase negative ($p < 0.05$). Relatively to the enzyme production, the profile of *Staphylococcus* for hemolysin α , β hemolysin, lecithinase, lipase, enterotoxigenic profile, as well as the production of biofilm was most prevalent to *S. aureus*. In multivariate analysis the production of pathogenicity factors from bacteria acted as a risk factor for infection, we suggest that lecithinase and possibly the biofilm play an important role in the occurrence of infections by the same agent carried in the nasal cavities.

1. INTRODUÇÃO

A diálise peritoneal é o método de substituição da função renal, alternativo à hemodiálise, utilizando uma membrana semipermeável de revestimento dos órgãos abdominais chamada de peritônio, que resulta em 1 a 2 m² de superfície filtrante.

Os primeiros resultados descritos com diálise peritoneal, publicados por POPOVICH et al. (1978), apontaram a peritonite como a principal complicação clínica dessa modalidade terapêutica, com incidência da ordem de 4,6 episódios / paciente-ano, época em que a solução de diálise utilizada era acondicionada em frascos de vidro. A substituição dos mesmos por bolsas plásticas, proposta por OREOPOULOS et al. (1978), determinou importante redução na incidência das infecções peritoneais para 2 episódios / paciente-ano. Na década de 80 houve substancial decréscimo na incidência das peritonites em diálise peritoneal pelo sistema em Y, que separou as bolsas de infusão e drenagem, permitindo antes da infusão, a realização do fluxo de solução de diálise estéril em equipos (BUONCRISTIANI et al., 1980); posteriormente, outro impacto foi com a introdução do sistema desconectável integrado, estéril, uma única conexão e duas bolsas previamente conectadas, totalmente descartáveis a cada troca de diálise (BAZZATO et al., 1980) e nas últimas duas décadas o impacto tecnológico foi com a diálise automatizada, na qual se realiza uma única conexão e os ciclos de diálise ocorrem em período controlado por um equipamento eletrônico que coordena os tempos de infusão, permanência e drenagem, pré-programados, individualmente.

Mesmo com todos os avanços tecnológicos e significativa queda na incidência das peritonites, essas se mantêm como a principal complicação da diálise peritoneal, sendo a causa mais freqüente de falência do método (SCHAUBEL et al., 2001) e importante impacto na mortalidade dos pacientes. (CARAMORI, 2011) avaliou retrospectivamente os vinte anos de diálise peritoneal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e mostrou que a incidência de peritonites diminuiu progressivamente de 1,64 episódio/paciente-ano em 1990 para 0,68 episódio/paciente-

ano em 2010; e nesse período a média foi de 0,96 episódio paciente-ano ou 1 episódio a cada 12,5 paciente-mês.

Diversos fatores de risco têm sido investigados em peritonites e nas infecções relacionadas ao cateter de diálise. Entre as características demográficas mais estudadas estão idade, raça, nível educacional e socioeconômico; assim como condições clínicas como diabetes melito, obesidade, perda da função renal residual e portador nasal (AMATO et al. 2001; HILDEBRAND et al., 2010; WANG et al., 2012).

A colonização nasal dos pacientes em diálise peritoneal, pelo gênero *Staphylococcus*, foi avaliada neste centro em estudo longitudinal, mostrando que 50% dos pacientes estudados eram portadores de *S. aureus* e 78,1% apresentavam colonização pelos estafilococos coagulase-negativa (ECN). O impacto dessas condições na ocorrência de peritonite foi estudado em 24 meses, a associação da mesma espécie que causou peritonite com a encontrada na microbiota do paciente ocorreu em 89% (BATALHA J. E. N., 2006; DINGES et al, 2000).

O gênero *Staphylococcus* destaca-se por ser importante patógeno de infecções comunitárias e hospitalares, são cocos Gram-positivo medindo 0,8 a 1,0 µm de diâmetro, subdividido em 47 espécies na maioria ECN, destacando-se *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. xylosus* entre outros. A exclusividade da produção da enzima coagulase atribui-se ao *S. aureus*, *S. schleiferi* subsps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*, *S. lutrae* e *S. agnetis* (EUZÉBY, 2012).

Os ECN são o maior constituinte da microbiota do ecossistema cutâneo humano, incluindo pele, membranas e mucosas, desenvolvendo ações de agente patogênico ao produzir infecções oportunistas em condições apropriadas, dependendo da sua capacidade de aderência às superfícies, do estímulo exagerado ou danos no sistema imune (CUNHA et al., 2006; BATALHA et al., 2010; PIETTE, VERSCHRAEGEN, 2009). Desta forma, há décadas, esses agentes estão entre os mais frequentes isolados bacterianos no laboratório de microbiologia (PFALLER, HERWALDT, 1988; PIETTE, VERSCHRAEGEN, 2009), e uma das maiores dificuldades na rotina laboratorial é a diferenciação entre linhagens patogênicas e linhagens contaminantes (KLEEMAN

et al., 1993; LYYTIKAINEN et al., 1998). A partir dos anos 70, houve um progresso considerável nos métodos de identificação e classificação dos *Staphylococcus* (KLOOS, SCHLEIFER, 1975). Novas metodologias não trouxeram somente a melhora no diagnóstico clínico e precisão na identificação laboratorial, mas também o conhecimento da variabilidade das espécies e subespécies de ECN de importância clínica, assim resultando no aumento da credibilidade do ECN como agentes patogênicos (KLOOS, BANNERMAN, 1994; CUNHA, 2004^a).

Em estudos latino-americanos, sempre o *S. aureus* foi a mais frequente causa de peritonites (SESSO et al., 1989), entretanto em revisão representativa dessa casuística na última década, (BARRETTI et al., 2007) mostraram que em muitos centros os ECN ocuparam o primeiro lugar como agente causador de peritonites em diálise peritoneal.

A espécie *S. aureus* entre os *Staphylococcus*, sem dúvida, é o patógeno humano mais importante, encontrado no ambiente externo e em narinas anteriores de 20 a 50% dos adultos, além de outros sítios de colonização, incluindo pregas cutâneas, axilas e região perineal, podendo causar uma ampla variedade de infecções adquiridas na comunidade ou em ambiente hospitalar (VON EIFF et al., 2001). Neste contexto, estudos mostraram prevalência quatro vezes maior de portadores nasais de *S. aureus* em diabéticos insulín-dependentes, quando comparados com diabéticos que utilizavam hipoglicemiantes orais (TUAZON et al., 1975) assim como em hemodialisados crônicos (KIRMANI et al., 1978). Esses estudos reforçaram a hipótese que a quebra da barreira cutânea é um evento de considerável importância na epidemiologia dos portadores, justificando a pesquisa em diferentes populações e reforçando a existência da relação entre estado de portador e disseminação de bactérias, sugerindo a propagação dos *Staphylococcus* (KLUYTMANS et al., 1997; AMATO et al., 2001; HAMDAN-PARTIDA et al., 2010).

Os critérios utilizados para identificação do portador de *Staphylococcus* têm variado amplamente nos diferentes estudos. Discutem-se quanto ao número de coletas, percentual de positividade da cultura nasal, período de seguimento das séries, características epidemiológicas das populações, aspectos que geram diferenças na interpretação dos resultados. Assim, pacientes têm sido classificados como portadores crônicos ou persistentes (coletas com culturas positivas em 75% ou mais), portadores

intermitentes (coletas com culturas positivas em menos que 75%) e não portadores (nenhuma cultura positiva) (SEWELL et al., 1982; VANDENBERGH, VERBRUGH, 1999). Desta forma, avaliações longitudinais em indivíduos saudáveis mostraram que 10 a 35% são portadores persistentes, 20% a 75% são intermitentes e 5 a 50% são não portadores (NOUWEN et al., 2001; VAN BELKUM et al., 2009^a). Similarmente, em diálise peritoneal as taxa de portadores nasais têm variado segundo autores, para SEWELL et al. (1982) 33% dos pacientes são portadores nasais de *S. aureus* e segundo DOEBBELING (1994), 50% dos pacientes em diálise são portadores de *S. aureus* nas fossas nasais, segundo eles situação que favorece a propagação para a mão e outros sítios. Em reforço a esses achados em nosso estudo anterior, foi observado que 25% dos pacientes eram portadores crônicos, 25% portadores intermitentes e 50% não portadores, encontrando índices semelhantes entre os sítios: cavidade nasal e pele pericater (BATALHA et al., 2010).

Quanto ao impacto do estado de portador na ocorrência de infecções, SESSO et al. (1989) mostraram que 37% dos pacientes em diálise peritoneal eram portadores crônicos, 28% intermitentes e 35% não portadores de *S. aureus*. Peritonites ocorreram predominantemente (69%) em portadores crônicos e em intermitentes (33%), e nenhum episódio ocorreu em pacientes não portadores; nesse estudo nacional fagótipos de *S. aureus* isolados de peritonites foram idênticos àqueles de culturas nasais e da pele pericater, mostrando fortes indícios da propagação dos *Staphylococcus*.

Ainda, na literatura nacional em diálise peritoneal, investigou-se a importância da similaridade entre espécies carregadas e causadoras de infecção que mostrou pela tipagem genotípica que 95% dos pacientes com colonização nasal, pele pericater e líquido de diálise eram portadores do mesmo subtipo, ressaltando a importância da fonte endógena de *S. aureus* no desenvolvimento de infecções (PIGNATARI et al., 1990).

Outro aspecto relevante tem sido avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos, ressaltando que a proporção de ECN, resistentes a meticilina, particularmente *S. epidermidis*, aumentou para até 90%, destacando-se a frequente resistência múltipla (OTTO, 2009). A afirmação é consistente para enfatizar a existência de associações entre a ascensão do ECN como causa de bacteremias nosocomiais e aumento

gradativo da resistência a agentes antimicrobianos (KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006). Destaca-se que a colonização do ECN em diversos sítios, se comporta como importante reservatório de cepas multirresistentes e de genes determinantes de resistência podendo ser transmitidos entre os ECN ou para outras espécies, como *S. aureus* (BARBIER et al., 2010).

Estudos procuram desvendar as relações entre a capacidade de colonização, produção de fatores de patogenicidade e os mecanismos associados à evolução clínica das infecções. DAY et al. (2001) usando técnicas moleculares relataram um número constante de genótipos de *S. aureus* carregados em uma população altamente associada com infecção. A conclusão foi que a ocorrência destes clones hipervirulentos e ecologicamente abundantes, sugere a existência de fatores que promovam adaptação ao meio ambiente e aumento da capacidade de colonização.

Por outro lado, a ocupação do nicho ecológico por outra bactéria como ECN, *Corynebacterium* spp, ou colonização artificial com cepa não virulenta de *S. aureus* 502A, pode ser um determinante para o estado de não portador de *S. aureus* entretanto, o mecanismo exato para este fenômeno ainda não está muito bem esclarecido (VAN BELKUM et al., 2009^b).

Doenças causadas por *Staphylococcus* podem ser resultantes de invasões diretas dos tecidos, como também por meio da ação de diversos produtos patogênicos produzidos pela bactéria (MARRACK, KAPPLER, 1990). Dentre os fatores que favorecem o aumento da persistência na colonização pelo *Staphylococcus*, aponta-se a produção microbiana de uma substância mucóide exopolimérica e que adere a superfícies de biomateriais, chamada biofilme (CORRIGAN et al., 2007). Para o ECN, os compostos polissacarídeos extracelulares que compõe esse biofilme tem sido um importante fator de patogenicidade, de forma que essa produção tem sido investigada especialmente em cateteres intravenosos, próteses entre outros (LIDUMA et al., 2012). Existem evidências que nas infecções por ECN a produção de biofilme interfere nas características patogênicas e em desfechos de infecções (KRISTINSSON et al., 1986; STECKELBERG et al., 1989).

AMMENDOLIA et al. (1999), avaliando 201 *Staphylococcus* isolados do sangue, de cateteres e do líquido de diálise, observaram que a produção de biofilme foi de 66 % entre os *S. epidermidis* e de 89% entre os *S. aureus*. A produção de biofilme tem sido sugerida como obstáculo terapêutico devido à persistência de infecção, cursando com falência dos tratamentos antimicrobianos. Assim, autores destacaram importante associação epidemiológica entre biofilme, ocorrência e recorrência de infecções e ECN potencialmente patogênicos (CUNHA MDE et al., 2004^b; ARSLAN, OZKARDES, 2007).

Outros fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções causadas por *Staphylococcus*. Esses fatores incluem as hemolisinas α , β , γ e δ , a leucocidina, as toxinas esfoliatinas A e B e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos, podendo estar relacionadas com modulação da resposta imune exacerbada e contribuindo para evasão do sistema imune e promoção de persistência da bactéria (FERENS, BOHACH, 2000). A toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) e as Enterotoxinas Estafilocócicas (EEs), causadoras de intoxicação alimentar estafilocócica, são a causa mais comum de diversas manifestações como náuseas, vômitos, diarreias (DINGES et al., 2000).

No presente estudo, com pacientes submetidos à diálise peritoneal pretende-se avaliar a influência dos fatores de patogenicidade dos *Staphylococcus* carregados na fossa nasal no risco de desenvolver peritonites e infecção do orifício de saída, na busca de evidências para o portador nasal como fator de risco. Ainda, pretende-se valorizar os *Staphylococcus* como os agentes mais envolvidos nas causas de infecções.

A originalidade do estudo está em apresentar qual o impacto da resistência microbiana, toxinas, enzimas e biofilme produzidos por *Staphylococcus* carregados na fossa nasal como potenciais fatores de patogenicidade no risco das infecções em diálise peritoneal.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Caracterizar as espécies de *Staphylococcus* isoladas da fossa nasal, quanto à virulência e susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos, e a influência desses fatores e das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes na ocorrência de infecções em diálise peritoneal.

Objetivos Específicos:

- Estudar a influência das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes para o estado de portador e no risco de infecção;
- Detectar a resistência a oxacilina e multirresistência nas amostras de *Staphylococcus* spp. carregadas na fossa nasal;
- Detectar fatores de virulência (enzimas, toxinas e biofilme) nas amostras de *Staphylococcus* spp. carregadas na fossa nasal;
- Estudar a influência da resistência microbiana e da virulência dos *Staphylococcus* spp. para o estado de portador e risco de infecção;
- Caracterizar por técnica genotípica a similaridade das linhagens de *Staphylococcus* spp. carregadas e da peritonite.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Estudo prospectivo observacional sem intervenção terapêutica, com recrutamento de todos os pacientes tratados por diálise peritoneal da Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, entre janeiro de 2003 a julho de 2004. Foram incluídos pacientes que não apresentaram episódios de infecções relacionadas à diálise peritoneal nos três meses anteriores a primeira coleta e que não receberam antibióticos no mês anterior. Foram excluídos os pacientes que não completaram as coletas de estudo, por perda de seguimento do tratamento, devido às transferências de serviço de diálise e/ou hemodiálise ou óbito.

A partir da seleção dos pacientes, foram obtidas informações relativas a dados gerais: idade, gênero (masculino ou feminino), raça (branca ou não branca); comorbidades como diabetes melito; método de diálise peritoneal (manual ou automática) e tempo de tratamento dialítico (em meses).

A população selecionada foi observada por período de 36 meses para avaliação das ocorrências de peritonites e infecções do cateter de diálise.

3.2. Seleção da amostra microbiológica

As coletas foram realizadas na fossa nasal de 32 pacientes obtendo-se 277 amostras, sendo 217 ECN e 60 *S. aureus*. Uma seleção de amostras foi realizada com critérios fenotípicos para avaliação da similaridade, iniciando-se pela identificação das espécies, seguida pela comparação do perfil de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, resultando-se na seleção final de 122 linhagens, sendo 102 ECN e 20 *S. aureus* (Figura 1). Dezenove amostras foram isoladas das infecções, como peritonites e infecção do orifício de saída.

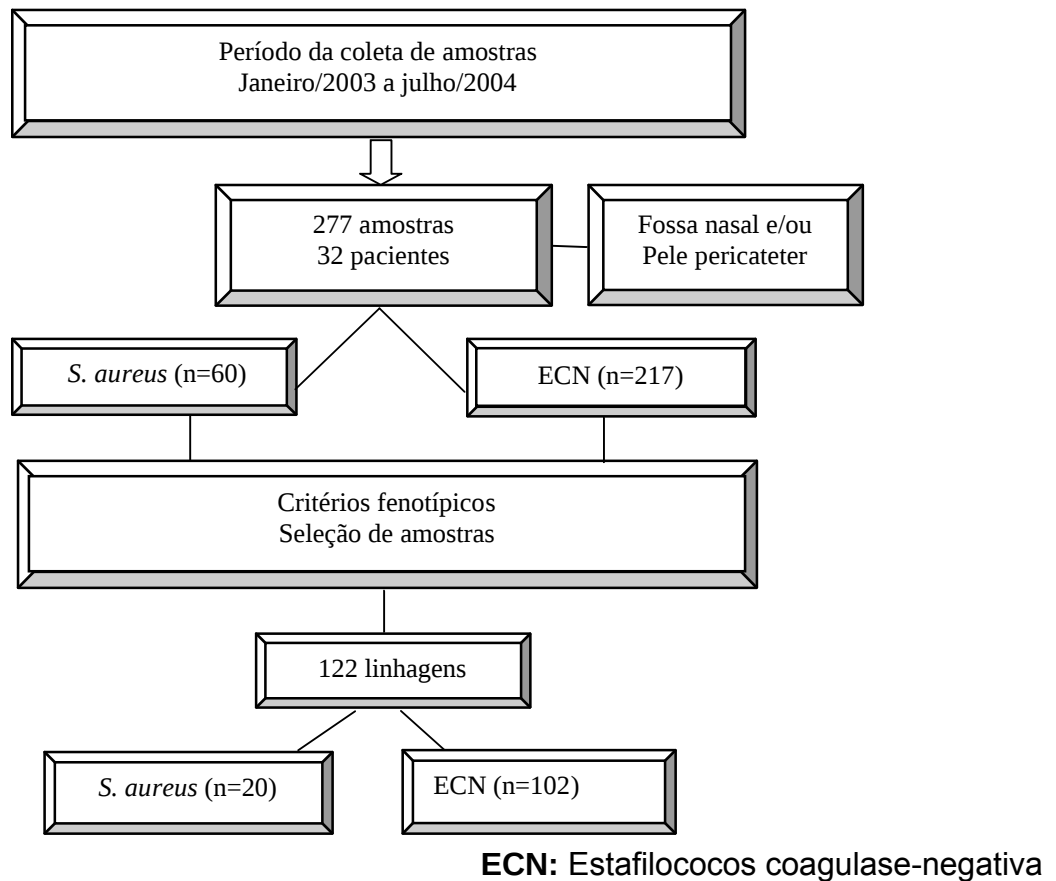


Figura 1: Resumo descritivo da seleção microbiológica das amostras carregadas em sítios extraperitoneais dos pacientes em Diálise Peritoneal

3.3. Delineamento

Investigou-se a influência dos fatores de risco do paciente (idade, sexo, raça, diabetes melito, método e tempo de diálise) e do agente etiológico (resistência a oxacilina, multirresistência, biofilme, lecitinase, lipase, hemólise α , hemólise β , e perfil toxigênico). Investigou-se também, a influência desses fatores na ocorrência de peritonites ou infecção do orifício de saída e no tempo livre até a ocorrência da primeira infecção.

Foi realizada a confirmação de similaridade entre amostras do paciente e respectiva peritonite por meio de técnicas genotípicas.

3.4. Classificação dos pacientes quanto ao estado de portador de *Staphylococcus* spp.

Considerando, exclusivamente, os resultados das três coletas nasais, os pacientes foram definidos em: **portador**, quando houve positividade em pelo menos uma coleta realizada e **não portador**, ausência do microrganismo nas três coletas.

3.5. Definição de peritonite

Peritonite foi definida como a ocorrência de efluente peritoneal turvo acompanhado de pelo menos um dos seguintes sinais ou sintomas: dor abdominal, descompressão abdominal brusca dolorosa, náuseas, vômitos ou febre. A presença de um destes sinais, isoladamente, só foi considerada como peritonite quando houve, concomitantemente, elevação da celularidade peritoneal no efluente da diálise com mais de 100 células/mm³ e predomínio de polimorfonucleares.

3.6. Definição da infecção do orifício de saída

Infecção caracterizada pela eliminação de secreção purulenta, associada ou não a outros sinais inflamatórios, como dor, calor e edema. A cultura bacteriológica positiva não foi obrigatória para confirmar diagnóstico. A observação regular do óstio do cateter foi realizada sem uso de lupas.

3.7. Coleta, processamento e armazenamento do material clínico.

3.7.1. Coleta nasal e da pele pericaterter

Foram coletadas amostras nasais e da pele adjacente ao cateter dos pacientes selecionados. A primeira coleta foi realizada no início do estudo, a segunda após sessenta dias e a terceira coleta entre nove e doze meses após a primeira coleta, foram usados *swabs* estéreis umedecidos com salina esterilizada; para coleta nasal foi

introduzido *swab* na fossa nasal anterior. Após a coleta, os materiais foram colocados no interior de tubos secos estéreis e imediatamente encaminhados ao laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, para a realização de semeadura em placas contendo meio de cultura *Columbia Agar Base* acrescido de 5% de sangue de carneiro ou coelho desfibrinado. Em sequência, foram semeados em Agar Baird-Parker, meio seletivo para *Staphylococcus*. Após incubação a 37°C por 24 horas foram submetidos ao procedimento de identificação dos microrganismos isolados.

Todos os procedimentos de coleta dos materiais para investigação do perfil das espécies que colonizam a flora da população avaliada foram supervisionados por um único profissional.

3.7.2. Coleta do efluente peritoneal das peritonites

Após suspeita clínica de peritonite, foram coletados assepticamente 50 ml de efluente peritoneal e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos; o sedimento foi inoculado em frascos contendo meios para hemoculturas, para processamento automático (BACTEC 9120 - BD®). Dos frascos positivos foram coletadas alíquotas para isolamento e identificação dos microrganismos, procedimento realizado pelo Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. As cepas de *Staphylococcus* previamente isoladas e utilizadas nesse estudo foram estocadas em meios específicos e armazenadas à -70° C, no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

3.7.3. Coleta de secreção pericater em infecção do orifício de saída

Após a caracterização da infecção do orifício de saída do cateter de diálise, foi realizada coleta com *swab* provido de meio de transporte passando sobre a pele adjacente ao orifício de saída do cateter, fazendo movimentos circulares delicados e encaminhado o material ao laboratório para processamento.

3.7.4. Identificação de *Staphylococcus* spp.

Na identificação microbiológica, as colônias foram submetidas à coloração de Gram para observação de morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as amostras submetidas às provas de catalase e coagulase, para confirmação do gênero *Staphylococcus*.

O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxidação e fermentação da glicose, resistência a bacitracina (0,04 U) indicada pela formação do halo de inibição com diâmetro de no máximo 9 mm e sensibilidade à furazolidona (100µg) caracterizada por halo maior que 15 mm de diâmetro (BAKER, 1984). Para diferenciação da espécie *S. aureus* dos ECN foi realizada a prova da coagulase. Na identificação das espécies dos ECN utilizou-se o método simplificado com provas bioquímicas, com testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, crescimento anaeróbico em meio tioglicolato, redução de nitrato, produção de hemolisinas, urease e ornitina descarboxilase (CUNHA et al., 2004^a).

3.8. Avaliação da atividade de drogas antimicrobianas *in vitro*

3.8.1. Técnica da difusão da droga em ágar (Método Kirby-Bauer)

O teste de susceptibilidade às drogas antimicrobianas foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo (CLSI, 2008). Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas a turbidez com a escala 0.5 de McFarland. Os discos utilizados foram: Penicilina G (10 UI), Oxacilina (1 µg), Cefalotina (30 µg), Netilmicina (30 µg), Ofloxacina (5 µg) e Vancomicina (30 µg). Os discos utilizados para o estudo foram todos produzidos pela CECON[®].

3.8.2. Análise de resultados da técnica de difusão em ágar

A interpretação de sensibilidade e resistência às drogas foi realizada obedecendo aos valores definidos de acordo com o (CLSI, 2008) como está detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de interpretação pelo método da técnica de difusão em ágar para a sensibilidade e resistência a seis drogas antimicrobianas

Agente antimicrobiano	Padrão de interpretação MEDIDA DO HALO (mm)	
	RESISTÊNCIA	SENSIBILIDADE
	A	
Penicilina	≤ 28	≥ 29
Cefalotina	≤ 14	≥ 18
Oxacilina para <i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 10	≥ 13
Oxacilina para ECN	≤ 17	≥ 18
Ofloxacina	≤ 14	≥ 18
Netilmicina	≤ 12	≥ 15
Vancomicina	< 15	≥ 15

Clinical Laboratory Standard Institute-CLSI (2008)

A partir dos resultados obtidos, foram analisadas linhagens de *Staphylococcus* quanto à resistência a oxacilina, multirresistência (resistência microbiana a mais de uma classe de droga) e para interpretação da similaridade entre as cepas carregadas e do efluente peritoneal.

3.9. Fatores de patogenicidade

3.9.1. Estudo da produção de biofilme

A pesquisa da produção de biofilme foi efetuada pelo método de CHRISTENSEN et al. (1982). Colônias isoladas de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue foram inoculadas em tubos de 12,0 x 75,0 mm contendo 2,0 ml de caldo Tripticase Soja (TSB - Difco) e incubadas a 37°C por 48 horas, sem agitação. Posteriormente, o conteúdo foi desprezado e alíquotas de 1,0 ml de solução aquosa a 0,4% de azul tripan (Sigma) ou azul de orto-toluidina (Merck) foram adicionadas em cada tubo. Após suave agitação, para garantir a coloração do material aderido à superfície interna dos tubos, o corante foi desprezado. O resultado positivo foi indicado

pela presença de uma camada de material corado aderido à parede interna dos tubos. A presença de um anel corado somente na superfície de contato líquido-ar, não foi considerada como resultado positivo.

3.9.2. Estudo da produção enzimática

Foram pesquisadas nas linhagens de ECN em estudo, a produção de hemolisinas, lipase, lecitinase, desoxirribonuclease (DNase) e termonuclease (TNase) conforme os seguintes métodos.

3.9.2.1. Determinação da produção de hemolisinas

A determinação da produção de hemolisinas α e β , foram realizadas em placas de Petri contendo "Blood Agar Base" (Difco) adicionado de 5% de sangue de coelho e de 5% de sangue de carneiro, respectivamente. As linhagens semeadas individualmente em quadrantes, foram incubadas a 37°C por 24 horas objetivando-se a detecção da hemolisina α . Para a caracterização da hemolisina β , as placas foram mantidas a essa temperatura por 24 horas e depois colocadas na geladeira por mais 72 horas. O resultado positivo foi indicado pela formação de zonas de hemólise ao redor do crescimento bacteriano.

3.9.2.2. Determinação de lipase e de lecitinase

A atividade lipolítica foi evidenciada em placas contendo "Blood Agar Base" enriquecido com 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1% de Tween 80 (Difco). As linhagens foram inoculadas em quadrantes e após incubação a 37°C por 18 horas e por mais 24 horas a temperatura ambiente, foram observadas quanto ao aparecimento de opacidade ao redor do crescimento, o que caracterizou o resultado positivo.

A produção de lecitinase foi estudada em meio de Baird-Parker (Oxoid), adicionado de 5,0% de solução de gema de ovo e 1,0% de Telurito de Potássio (K_2TeO_3). O resultado positivo foi indicado pela formação de halo opaco ao redor do crescimento.

3.9.2.3. Determinação de DNase e TNase

A DNase e TNase foram determinadas pela técnica da difusão metacromática em agar azul de ortotoluidina-DNA (TDA). Para a detecção de DNase, foram utilizados sobrenadantes obtidos a partir do cultivo bacteriano em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) previamente incubadas a 37°C por 24 horas e centrifugadas por dez minutos a 8.000 x g / 4°C. Esses sobrenadantes foram colocados em orifícios de 7 mm efetuados no ágar e incubados a 50°C por quatro horas. Na sequência, para detecção da produção de TNase, os sobrenadantes foram previamente aquecidos em banho-maria, a 100°C por 20 minutos e colocados nos orifícios. Para ambas as determinações, o resultado da atividade nucleásica foi expresso medindo-se em milímetros o diâmetro do halo róseo formado no meio de difusão. A interpretação dos resultados positivos foi realizada através da comparação dos halos obtidos com linhagem padrão de *S. aureus* (ATCC 25923). Os sobrenadantes obtidos a partir do método de cultura em saco de diálise conforme descrição abaixo, também foram testados quanto à produção de DNase e TNase.

3.9.3. Determinação do perfil toxigênico

O perfil toxigênico das linhagens foi analisado quanto à produção de enterotoxinas e Toxina 1 do Choque Tóxico (TSST-1).

3.9.3.1. Produção toxigênica

Para a determinação do perfil toxigênico foi utilizada a técnica de produção de toxinas pelo método de saco de diálise. Com este objetivo, sacos de diálise (Difco) de 30 a 40 cm foram previamente lavados em água destilada, amarrados em uma das extremidades e a seguir preenchidos com 50 ml de caldo BHI em concentração dupla e amarrados na outra extremidade. Os sacos assim preparados foram colocados em *erlenmeyers* de 250 ml para adotarem a forma de U no fundo do frasco; volume de 18 ml de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,4 em 0,9% de NaCl foram adicionados aos mesmos. Esses foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C.

Posteriormente em seu interior, foi inoculada uma alçada das amostras previamente cultivadas em 5,0 ml de caldo BHI a 37°C por 18 horas. Estas misturas foram então incubados a 37°C por 24 horas com agitação de 200 rpm. Após este período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 8.000 x g / 4°C, durante dez minutos. Os sobrenadantes obtidos foram conservados a -20°C até o seu uso.

3.9.3.2. Detecção de enterotoxinas e de TSST-1

A detecção desses produtos extracelulares foi realizada pelo método da aglutinação reversa passiva de látex (RPLA). Para a realização dos testes foram utilizados os Kits SET-RPLA-T900 e TST-RPLA-TD940 (Oxoid Diagnostic Reagents) para a detecção da enterotoxina A (EEA), enterotoxina B (EEB), enterotoxina C (EEC), enterotoxina D (EED), e da toxina do choque tóxico (TSST-1), respectivamente. A seguir, foram adicionados 25 µl do látex sensibilizado com as anti-enterotoxinas e anti-TSST-1. As toxinas padrão foram utilizadas como controle positivo e as reações inespecíficas foram analisadas adicionando-se 25 µl do sobrenadante em 25 µl do látex controle. As placas assim preparadas foram cobertas com celofane estéril e os reagentes homogeneizados em micromixer por três minutos. Após incubação durante 20 a 24 horas em temperatura ambiente, os resultados foram registrados com o auxílio de uma lupa e iluminação sobre fundo escuro. A reação positiva foi classificada em (+), (++) e (+++) de acordo com o padrão de aglutinação descrito pelo fabricante. A formação de um botão róseo foi interpretada como resultado negativo.

3.10. Técnicas Genotípicas

3.10.1. Extração do Ácido Nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue, inoculadas individualmente em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas.

A extração foi realizada com o Kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de *Staphylococcus* com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir, 500 µl da solução de extração

foram adicionadas à mistura e esta foi centrifugada a 10.000 x g por quatro minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por um minuto. 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 foi adicionado à coluna e esta submetida à centrifugação a 20.000 x g por três minutos. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70 °C foi utilizada para a eluição.

Posteriormente foi feita a determinação da A_{260} e A_{280} da diluição 1:100 do ácido nucléico extraído para a obtenção da concentração e pureza da amostra.

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição}$$

3.10.2. Análise de RAPD

Foram empregados na análise de RAPD dois primers arbitrários: primer M13 (5'- GAG GTT GGC GGT TCT-3') e o primer 7 (GTGGATGCGA). As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 1 µM de cada primer, 1,0 U de Taq polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados e 150 ng de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado para o primer M13 que consistiram de: 94°C por dois minutos para o primeiro ciclo seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* a 25°C por um minuto e extensão a 72°C por quatro minutos, e um ciclo final de 94° C por um minuto, 25°C por um minuto e 72°C por oito minutos. Para o primer 7 a amplificação foi iniciada com 94°C por quatro minutos e 35 ciclos a 94° C por um minuto, 25°C por um minuto e 72°C por dois minutos. Após completar os 35 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por dois minutos. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 14458, *S. aureus* ATCC 19095, *S. aureus* ATCC 23235, *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xyloso* (ATCC 29979).

3.10.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com Brometo de Etídeo. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

3.10.4. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

A tipagem por PFGE foi realizada utilizando a enzima de restrição *Sma*I, conforme protocolo descrito por MCDUGAL et al. (2003). Após 18-24 horas de incubação a 37°C da amostra bacteriana inoculada em 4 mL de caldo BHI; alíquota de 100µL (para *S. aureus*) ou 200µL (para ECN) foram centrifugados por dois minutos a 12.000g. Após desprezo dos sobrenadantes as células foram ressuspensas com 150 µL de solução TE (Tris 10 mM; EDTA 1mM; pH=8,0) e 25 µL de lisostafina (100 µg/mL). Após homogeneização, 150 µL de agarose *low melting* 1.8% em TBE 0.5X foram acrescentados ao tubo e o homogeneizado foi distribuído em moldes para preparação dos plugues (Biorad). Após solidificação, plugues foram incubados em solução EC (Tris HCl 1M; NaCl 2M; EDTA tetrassódico 1M; desoxicolato de sódio 2%; sarcosil 5%, Brij 5%) por 18 horas, a 27°C e lavados por quatro vezes com solução TE 1X. Uma fração do plugue foi digerido com enzima de restrição *Sma*I e submetido a eletroforese em campo pulsado, por 21 horas, a 14°C, a 6V/cm, em gel de agarose a 1%. Após o término da eletroforese, o gel foi corado com intercalante GelRed por 50 min. e fotografado sob luz ultravioleta para posterior análise. Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando-se o software de bioinformática BioNumerics versão 6.1 (Applied Maths). Foram analisados os agrupamentos realizados pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

3.11. Métodos Estatísticos

Para avaliar a associação entre a produção do fator de patogenicidade isolado e a ocorrência de infecção, foram utilizados teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Foi obtida a distribuição de frequências e percentuais das infecções segundo espécie e distribuição de frequência das infecções segundo subtipos em cada espécie.

Modelos de regressão logística foram utilizados para avaliar as influências das variáveis clínicas e microbiológicas no portador de *S. aureus* e na ocorrência de infecções relacionadas à diálise. Foram realizadas análises separadamente para todos *Staphylococcus* e para espécies.

Considerando o tempo livre até a primeira infecção como variável resposta, foram realizados modelos de regressão de Cox, separadamente para variáveis clínicas ou microbiológicas.

Para análise de similaridade entre as cepas (técnicas moleculares) o método utilizado foi UPGMA com distância Euclidiana, utilizando-se o software de bioinformática BioNumerics versão 6.1.

Para as análises acima citadas foi utilizado o software SAS v. 9.2 através do Procedimento GENMOD.

Em todas as hipóteses testadas a estatística calculada foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características da população estudada

A tabela 1 apresenta as características dos 32 pacientes estudados. A idade variou entre 21 a 85 anos, com média de $54,7 \pm 17$ anos; 15 (46,9%) pacientes apresentaram 60 anos ou mais; houve predomínio da cor branca com 27 (84,4%); 20 eram do sexo masculino (62,5%) e 13 (40,6%) eram diabéticos. Em 24 pacientes o método de diálise foi manual, enquanto que oito (25%) o tratamento dialítico realizado era automatizado. O tempo médio de diálise foi de $34,6 \pm 20$ meses.

Tabela 2- Características de 32 pacientes, submetidos à diálise peritoneal domiciliar, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

	Número	(%)
Idade (<i>média em anos</i>)	54,75 ±17	
Gênero		
<i>Masculino</i>	20	(62,5)
<i>Feminino</i>	12	(37,5)
Cor		
<i>Branco</i>	27	(84,4)*
<i>Não Branco</i>	5	(15,6)
Diabetes melito		
<i>Sim</i>	13	(40,6)
<i>Não</i>	19	(59,4)
Método de diálise		
<i>Manual</i>	24	(75)*
<i>Automatizada</i>	8	(25)

(*) $p < 0.05$

4.2. Frequência dos pacientes quanto ao estado de portador de *Staphylococcus* spp.

Considerando os 32 pacientes, avaliados quanto ao estado de portador de *Staphylococcus* spp, 50% (n=16) dos pacientes foram portadores de *S. aureus*. Quanto à *S. epidermidis*, 78,1% (n=25) pacientes foram classificados como portadores. Dos pacientes que apresentaram outros ECN (*S. warneri*, *S.*

haemolyticus, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. schleiferi*) 65,6% (n=21) foram classificados como portadores e 34,4% (n=11) como não portadores.

4.3. Caracterização das espécies carregadas

Das 122 linhagens selecionadas de 32 pacientes, 20 (16,6%) pertenceram à *S. aureus*, 62 (51,2%) à *S. epidermidis*, 16 (13,2%) à *S. warneri*, 12 (9,9%) foram de *S. haemolyticus*, quatro (3,3%) de *S. saprophyticus* e sete (5,8%) de outros ECN.

4.4. Atividade antimicrobiana *in vitro*

Quanto à atividade antimicrobiana *in vitro*, a resistência à oxacilina foi detectada em 20,5% (n=25) de todos os *Staphylococcus* sendo que dos *S. aureus* somente 5% (n=1) foi resistente à oxacilina e dos ECN 23,5% (n=24) apresentaram resistência à oxacilina. A multirresistência foi observada em 10% (n=2) das amostras de *S. aureus* e em 27,5% (n=28) dos ECN. Dos *S. epidermidis* 32,7% (n=20) foram resistentes à oxacilina e 34,4% (n=21) multirresistentes. Quanto ao *S. warneri* não foram encontradas amostras resistentes à oxacilina ou multirresistentes. Dos *S. haemolyticus* 30,8% (n=4) foram resistentes à oxacilina e 23,1% (n=3) multirresistentes. Quanto aos outros ECN, nenhuma linhagem foi considerada oxacilina resistente ou multirresistente.

A comparação da resistência à oxacilina mostrou que *S. epidermidis* foi significativamente mais resistente do que *S. aureus* (p=0,01), *S. warneri* (p=0,05) e aos outros ECN (p=0,05). Quanto à multirresistência o *S. epidermidis* foi superior ao *S. aureus* (p=0,04), ao *S. warneri* (p=0,03) e aos outros ECN (p=0,02).

Tabela 3- Perfil de atividade antimicrobiana das espécies de *Staphylococcus* isoladas de pacientes submetidos à diálise peritoneal, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Perfil	Resistência a Oxacilina	Multirresistência
<i>S. aureus</i> (n=20)	5 %	10%
<i>S. epidermidis</i> (n=61)	32.7%*	34.4%*
<i>S. warneri</i> (n=17)	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=13)	30,8%	23.1%
Outros ECN (n=11)	-	-
Total ECN (n=102)	23.5%	27.5%

(*) $p < 0.05$; ECN: estafilococos coagulase-negativa

4.5. Produção de fatores de patogenicidade

4.5.1. Produção enzimática

A hemolisina α foi a enzima mais produzida pelos *Staphylococcus* (n=122) com 58,2% (n=71) de positividade. Em 20 linhagens de *S. aureus*, a produção de enzimas foi igual ou superior a 80%. Enquanto em 102 linhagens de ECN, a produção de hemolisina α foi em torno de 53% (n=54), sendo 54% (n=33) nos 61 *S. epidermidis*, 47% (n=8) nos 17 *S. warneri*, 84,6% (n=11) nos 13 *S. haemolyticus* e 18.2% (n=2) nos 11 outros ECN. A produção de hemolisina β em todos *Staphylococcus* foi em torno de 27% (n=33), e a diversidade pode ser observada na tabela 4.

A comparação da produção de hemolisina α entre os *Staphylococcus* mostrou que o *S. aureus* foi superior à maioria das espécies de ECN, exceto para os *S. haemolyticus*; o *S. epidermidis* foi superior aos outros ECN ($p=0,01$) e similar com as demais espécies avaliadas; o *S. haemolyticus* foi superior ao *S. warneri* ($p=0,05$) e aos outros ECN ($p<0,01$) e o *S. warneri* foi similar aos outros ECN ($p=0,09$). Quanto à produção de hemolisina β , o *S. aureus* mostrou produção superior ao *S. epidermidis* ($p=0,02$) e ao *S. warneri* ($p<0,01$) e similar ao *S. haemolyticus* ($p=0,7$) e

aos outros ECN ($p=0,7$); o *S. epidermidis* não apresentaram diferença com nenhum grupo ao passo que o *S. haemolyticus* foi superior ao *S. warneri* ($p=0.05$); os outros ECN foram superiores apenas ao *S. warneri* ($p=0,05$) (Tabela 4).

A produção de lecitinase e lipase foi maior entre os *S. aureus* ($p<0,01$), estando presente em quase a totalidade das amostras dessa espécie. A produção dessas enzimas não apresentou diferença entre as espécies de ECN (Tabela 4).

Quanto à produção das enzimas DNase e TNase a maior produção ocorreu em linhagens de *S. aureus* quando comparadas aos demais *Staphylococcus* ($p<0,01$). Não houve diferença na produção entre as espécies de ECN (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das espécies de *Staphylococcus* positivas quanto à produção enzimática

Enzimas (%)	hemolisina α	hemolisina β	lecitinas e	lipas e	DNAs e	TNAs e
<i>S. aureus</i> (n=20)	85,0*	50,0*	95,0*	95,0*	80,0*	80,0*
<i>S. epidermidis</i> (n=61)	54,0*	21,3	18,0	31,1	3,2	3,2
<i>S. warneri</i> (n=17)	47,0	5,9	5,9	17,4	0,0	0,0
<i>S. haemolyticus</i> (n=13)	84,6*	38,5*	23,1	7,7	0,0	0,0
Outros ECN (n=11)	18,2	36,4*	36,4	18,2	18,2	9,1
Total ECN (n=102)	52,9	22,5	16,7	23,5	3,9	2,9
Total (n=122)	58,2	27,0	31,1	36,0	16,4	15,6

(*) $p<0.05$; ECN: estafilococos coagulase-negativa

4.5.2. Produção de biofilme

A produção de biofilme pelos *Staphylococcus* spp. foi de 63,1%. Dentre os *S. aureus* 80% (n=16) de suas 20 linhagens, superior quando comparados aos 102 ECN, com 59,8% (n=61) de positividade ($p=0,004$). A positividade de 65,6% foi detectada em 61 linhagens dos *S. epidermidis*, e em 70,6% dos *S. warneri* (n=17) e de 38,5% entre as 13 linhagens de *S. haemolyticus*. A frequência de linhagens de ECN e de *S. aureus*, produtoras de biofilme estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Produção de biofilme entre as espécies de *Staphylococcus*

Espécies (total)	Positividade das cepas (%)
<i>S. aureus</i> (n=20)	80*
<i>S. epidermidis</i> (n=61)	65,6
<i>S. warneri</i> (n=17)	70,6
<i>S. haemolyticus</i> (n=13)	38,5
Outros ECN (n=11)	36,4
TOTAL de ECN (n=102)	59,8
TOTAL (n=122)	63,1

Método de Christensen; (*) $p < 0.05$

4.5.3. Perfil toxigênico

Entre os *S. aureus*, o percentual toxigênico positivo foi de 15% (n=3) para enterotoxina A (EEA), 5% (n=1) para enterotoxina B (EEB), 50% (n=10) para enterotoxina C (EEC), 10% (n=2) enterotoxina D (EED) e 40% (n=8) para TSST-1. A produção concomitante de duas ou mais toxinas, ocorreu em 50% (n=10) dos casos na maioria EEC e TSST-1.

Considerando as 102 linhagens de ECN, 40,2%(n=41) foram positivas para alguma toxina, em 11,7% (n=12) foi observado positividade para EEA, 5,9% (n=6) para EEB, 1% (n=1) para EED e 5,9% (n=6) para TSST-1. Quanto á produção de EEC a positividade ocorreu em 36,3% (n=37), desses 54,0% (n=20) ocorreu concomitante com outras diferentes toxinas, sendo EEA a mais frequente, presente em 55% (n=11).

As frequências de EEA, EEB, EEC e EED foram semelhantes entre as espécies de *Staphylococcus*. Entretanto, a produção de TSST-1 pelo *S. aureus* foi superior aos *S. epidermidis* ($p < 0,01$), aos *S. warneri* ($p < 0,01$) e aos *S. haemolyticus* ($p = 0,05$) e semelhante aos outros ECN ($p = 0,2$); entre as espécies de ECN a produção foi semelhante. Embora não havendo diferença significativa, a EEC foi a mais frequente entre os *Staphylococcus* estudados.

4.6. Caracterização epidemiológica e clínica determinantes para portador de *S. aureus*

A análise das características epidemiológicas e clínicas de 32 pacientes em mostrar o que foi determinante para ser portador de *S. aureus* revelou que a cor branca e diabetes melito conferiram maior chance do paciente ser portador de *S. aureus*, 8,2 e 3,3 vezes respectivamente; ao passo que o avançar da idade e do tempo de diálise diminuíram a chance em 8,6%/ano e 3,7%/ano respectivamente.

Tabela 6: Características do portador de *S. aureus*

Variáveis	Categorias	p valor	OR	IC(95%)
Idade	Continua	<0,001	0,91	0,87 – 0,95
Raca	B vs NB	0,002	8,22	2,06 – 32,69
Sexo	M vs F	0,96	1,02	0,35 – 2,98
Diabetes Melito	S vs N	0,04	3,27	1,02 – 10,52
Tempo de diálise	Continua	0,009	0,96	0,93 – 0,99
Método de diálise	Ma ou A	0,93	1,05	0,328– 3,38

M: masculino, F: feminino; B: branco, NB: não branco; Ma: manual, A: automatizada; S: sim, N: não; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança

4.7. Patogenicidade dos *S. aureus* carregados na fossa nasal

Para resumir a patogenicidade das 20 linhagens de *S. aureus* carregados na fossa nasal observaram-se suas características, quanto a resistência à oxacilina foi detectada em 5% (n=1) e a multirresistência foi observada em 10% (n=2). Quanto à produção enzimática, a hemolisina α foi encontrada em 85% (n=17), sendo que a hemolisina β em 50% (n=10); tanto a lecitinase como a lipase foram detectadas em 95% (n=19) das amostras enquanto que a DNase e TNase em 80% (n=16). No perfil toxigênico, a toxina C foi a mais prevalente, sendo detectada em 50% (n=10) dos *S. aureus*. Com relação a produção de biofilme, a detecção foi de 80% (n=16).

4.8. Influência epidemiológica e clínica dos pacientes portadores de *Staphylococcus* spp. no risco de infecções relacionadas à diálise peritoneal

Ao avaliar a influência das características epidemiológicas e clínicas dos pacientes portadores das espécies de *Staphylococcus* spp. no risco de infecções relacionadas à diálise peritoneal, observou-se que dentre todos pacientes o *status* de portador de *S. aureus* aumentou o risco de infecção relacionada à diálise em 11 vezes; assim como o sexo feminino tiveram a chance aumentada em nove vezes ($p=0,06$).

Tabela 7: Influência das características dos pacientes portadores de *Staphylococcus* no risco de infecção

Variáveis	Categorias	p valor	OR	IC(95%)
Idade	Continua	0,70	0,89	0,51– 1,57
Raca	NB vs B	0,12	0,07	0,003 – 2,072
Sexo	F vs M	0,06	9,76	0,89 – 106,89
Método de diálise	A vs Ma	0,87	1,18	0,14 – 9,79
Tempo de diálise	Continua	0,49	1,01	0,97 – 1,06
Status <i>S. aureus</i>	P vs NP	0,04	11,10	1,01 – 121,13

M: masculino, F: feminino; B: branco, NB: não branco; S: sim, N: não; P: portador, NP: não portador; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança; A: automatizado, Ma: manual

4.9. Influência das características clínicas e epidemiológicas no tempo livre de infecções relacionadas à diálise peritoneal

Ao analisar quais características clínicas e epidemiológicas influenciaram no tempo livre de peritonite ou infecção do orifício de saída do cateter, observou-se que o sexo feminino aumentou em 6,3 vezes a probabilidade de ocorrência da primeira infecção, enquanto que o avanço da idade implicou em 5,6% menor risco por ano.

Tabela 8: Características clínicas e epidemiológicas na influência do tempo livre até a 1ª infecção.

Variáveis	Categorias	p valor	OR	IC(95%)
Idade	Continua	0,02	0,94	0,89 – 0,99
Sexo	F vs M	0,03	6,03	1,13 – 32,20
Raça	NB vs B	0,42	2,14	0,32 – 14,28
Diabetes Melito	S vs N	0,26	2,88	0,44 – 18,51
Status <i>S. aureus</i>	P vs NP	0,71	1,31	0,29 -5,80
Método de diálise	Ma ou A	0,99	1,00	0,21 – 4,56
Tempo de diálise	Continua	0,28	1,02	0,98 – 1,06

M: masculino; F: feminino; B: branco; NB: não branco; Ma: manual; A: automatizada; S: sim, N: não; P: portador, NP: não portador; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança

4.10. Influência da patogenicidade de *Staphylococcus* spp. carregados no risco de infecção relacionada à diálise peritoneal

A análise da produção de fatores de patogenicidade de 122 linhagens de *Staphylococcus* carregados nos pacientes da diálise peritoneal não influenciou na ocorrência de peritonite e infecção do orifício de saída. Mas, considerando os fatores de patogenicidade produzidos pelos ECN, observou-se que a produção de lecitinase influenciou no risco aumentando em oito vezes a ocorrência das infecções (OR=7,51, IC=1,53 – 37,03; p= 0,01), enquanto que a produção de biofilme aumentou a chance em 5,3 vezes na ocorrência de infecções (OR=5,319, IC=0,881 – 32,258), resultado relevante, porém não significativo (p= 0,06).

Tabela 9: Influência da patogenicidade dos ECN no risco de infecções em pacientes portadores

Variáveis	Categorias	p valor	OR	IC(95%)
Lecitinase	Sim vs Não	0,01	7,51	1,53 – 37,03
Biofilme	Sim vs Não	0,06	5,31	0,88 – 32,25
Lipase	Sim vs Não	0,93	1,07	0,20 – 5,55
Toxinas B	Sim vs Não	0,75	1,58	0,08 -28,57
Toxinas C	Sim vs Não	0,15	3,74	0,61 – 22,62
Oxacilina	R vs S	0,81	1,45	0,06 – 34,93
Multirresistência	Sim vs Não	0,53	2,69	0,12 – 59,67

R: resistente, S: sensível; OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança.

4.11. Influência da patogenicidade da bactéria no tempo livre de infecção relacionada à diálise peritoneal

A análise da produção de fatores de patogenicidade de 122 linhagens de *Staphylococcus* carregados nos pacientes da diálise peritoneal não influenciou no tempo livre de peritonite e infecção do orifício de saída.

4.12. Associação entre produção de fatores de patogenicidade e ocorrência de infecção

Das 16 linhagens relacionadas com infecção, 68,7% (n=11) foram positivas para hemolisina α e 31,2% (n=5) produziram hemolisina β . Não foi verificada associação entre a produção de hemolisina α e β e ocorrência de infecção (p=0,42 e p=0,76, respectivamente).

A produção de lecitinase foi detectada em 68,7% (n=11) das linhagens relacionadas à infecção enquanto que a lipase foi detectada em 56,2% (n=9). Somente a lecitinase mostrou-se ter relação com a infecção (p=0,001 e p=0,12, respectivamente).

Nas linhagens associadas com infecções a DNase e a TNase foram igualmente positivas em 25% das amostras (n=4). As enzimas DNase e TNase não apresentaram relação com infecção (p=0,29).

Das 16 linhagens, 6,2% (n=1) foram positivas para enterotoxina EEB e em 25% (n=4) foi detectada positividade para EEC. Não houve produção de enterotoxinas EEA e EED. A produção de TSST-1 foi positiva em 18,7% (n=3) das 16 linhagens relacionadas com infecção. A produção de enterotoxinas (B, C D e TSST-1) não mostrou associação com a ocorrência de peritonites (p=1,0, p=0,28 e p=0,39, respectivamente).

A detecção de biofilme nas 16 linhagens relacionadas com infecção pode ser observada em 87,5% (n=14) dos casos, apresentando associação significativa com a infecção (p=0,04).

4.13. Associação entre espécies de *Staphylococcus* carregadas e ocorrência de infecção

Das 20 linhagens de *S. aureus* carregadas na fossa nasal, 35% (n=7) resultaram na ocorrência de peritonite e infecção do orifício de saída. Das 102 linhagens de ECN, 8,8% (n=9) foram associadas com a ocorrência dessas infecções. Isoladamente, as 61 linhagens de *S. epidermidis*, 13,1% (n=8) foram associadas com infecções, bem como 5,9% (n=1) das 17 linhagens de *S. warneri*. As demais espécies de *Staphylococcus*, não foram associadas com infecções. A análise comparativa entre as espécies de ECN carregadas na fossa nasal e pele com a ocorrência de infecções não mostrou diferença significativa, entretanto a frequência de *S. aureus* na ocorrência de infecções mostrou ser superior em relação às demais espécies de ECN em conjunto (p=0,02).

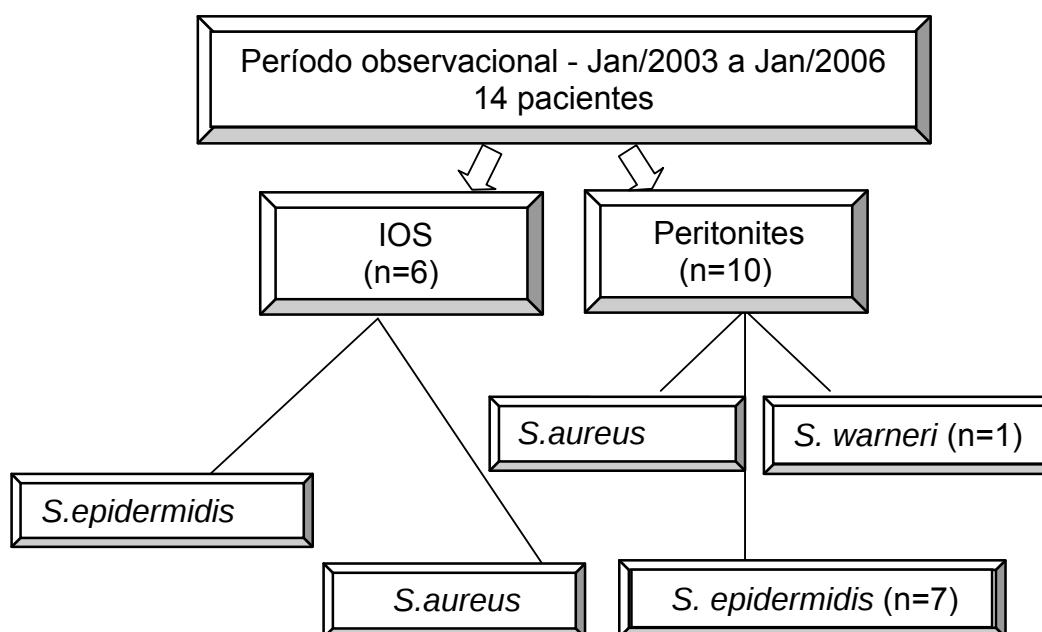


Figura 2: Resumo descritivo das infecções relacionadas à diálise peritoneal

4.14. Investigação de similaridade entre as linhagens isoladas (técnicas genotípicas)

Investigação da similaridade por testes genotípicos foi realizada entre amostras dos pacientes que evoluíram com peritonites e as respectivas bactérias isoladas dessas infecções.

Os métodos de tipagem molecular Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) utilizando os *primers* RAPD 7 e M13 e o método e Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) foram utilizados para avaliação da similaridade entre as linhagens isoladas de sítios extraperitoneais e as dos episódios de peritonite. A tipagem molecular das amostras isoladas da fossa nasal e do líquido peritoneal revelou que dos oito pacientes que evoluíram com peritonites, 87,5% (n=7) apresentou similaridade de 95% a 100% entre as linhagens carregadas pelos pacientes e as associadas com a infecção (Figuras 3, 4 e 5).

Em análise das linhagens de *S. aureus* de sítios extraperitoneais e da peritonite de em um paciente (paciente 06), houve 77,3% de similaridade com a cepa padrão HU 25 pertencente ao Clone Epidêmico Brasileiro (CEB) com cassete cromossômico mec do Tipo III multirresistente e de origem hospitalar, sugerindo relação entre estas linhagens e a procedência da infecção. Da mesma forma observou-se uma similaridade de 75,5% entre a linhagem de outro paciente (paciente 25) e os clones padrões do Tipo IV de origem comunitária WB49 e JCSC4469. Essas características podem ser observadas na figura 6.

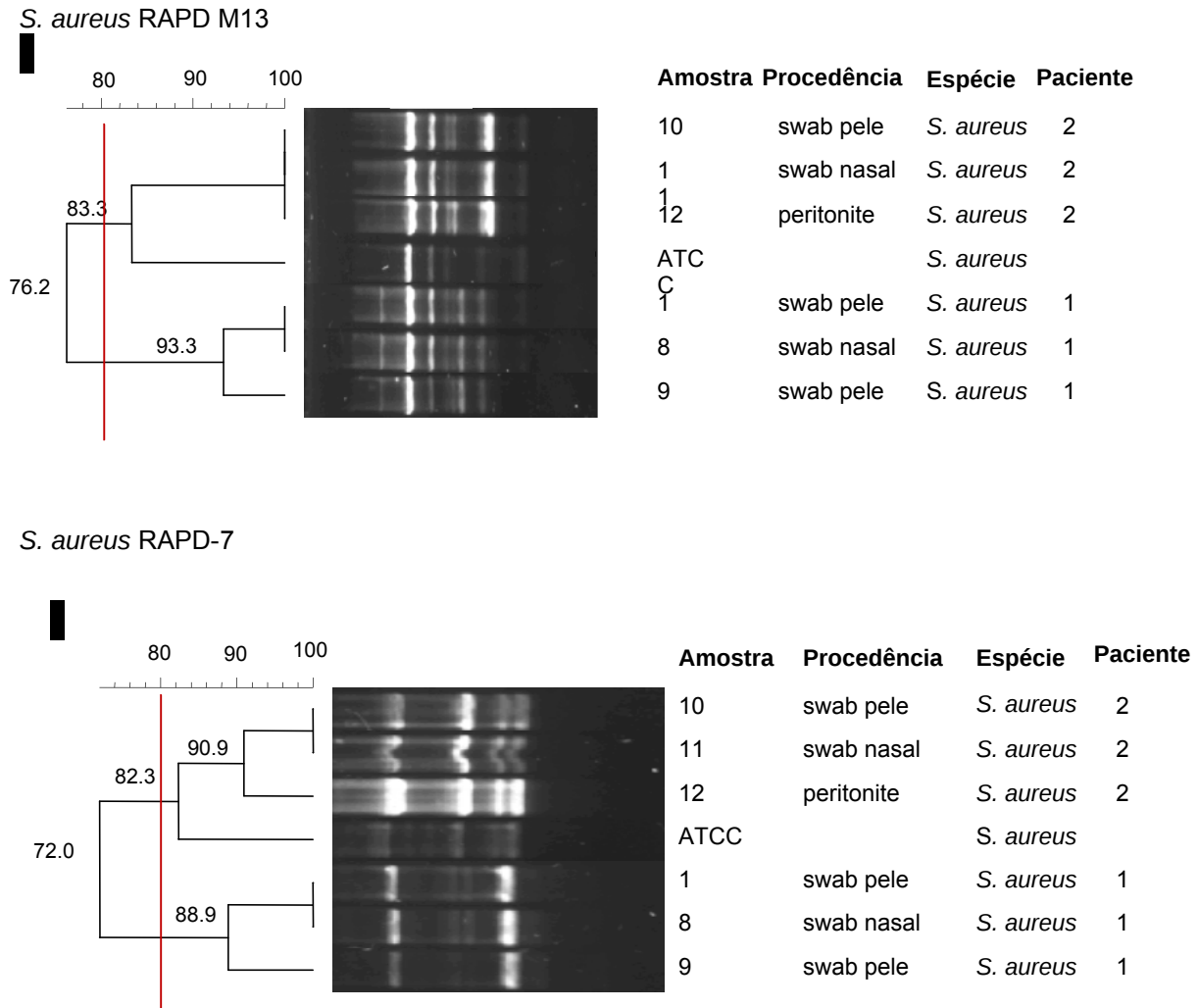
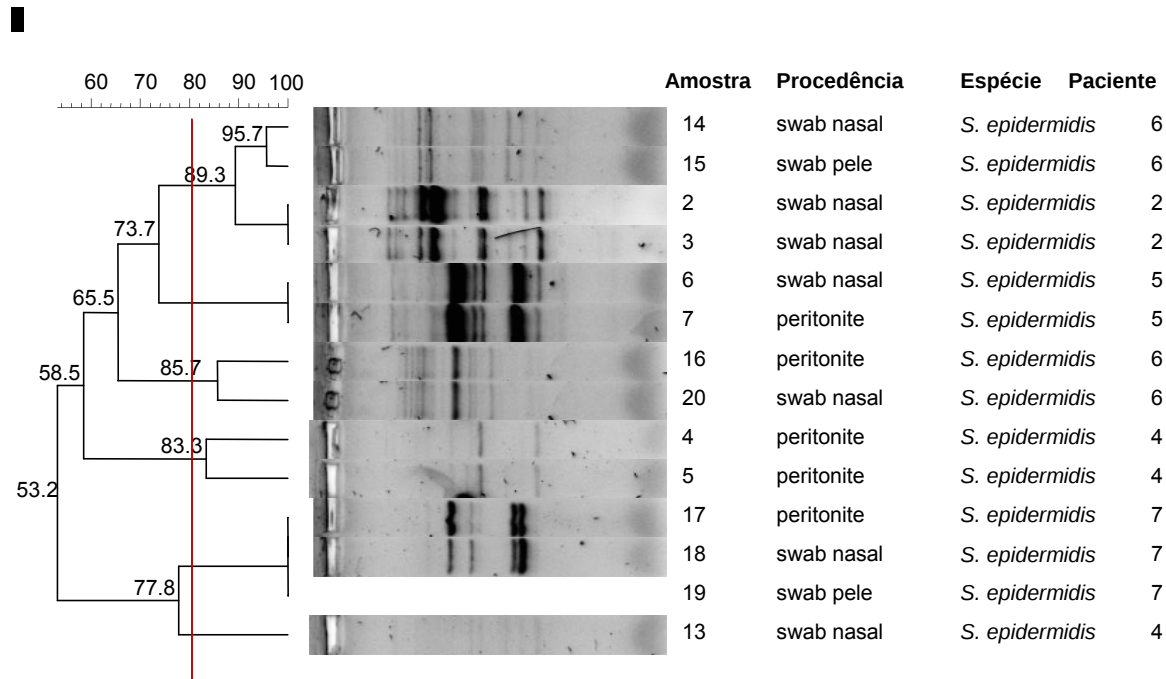


Figura 3: Dendogramas de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de fossa nasal, pele e líquido peritoneal de pacientes em diálise peritoneal analisadas pelo método de tipagem molecular Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

S. epidermidis RAPD-7



S. epidermidis RAPD M13

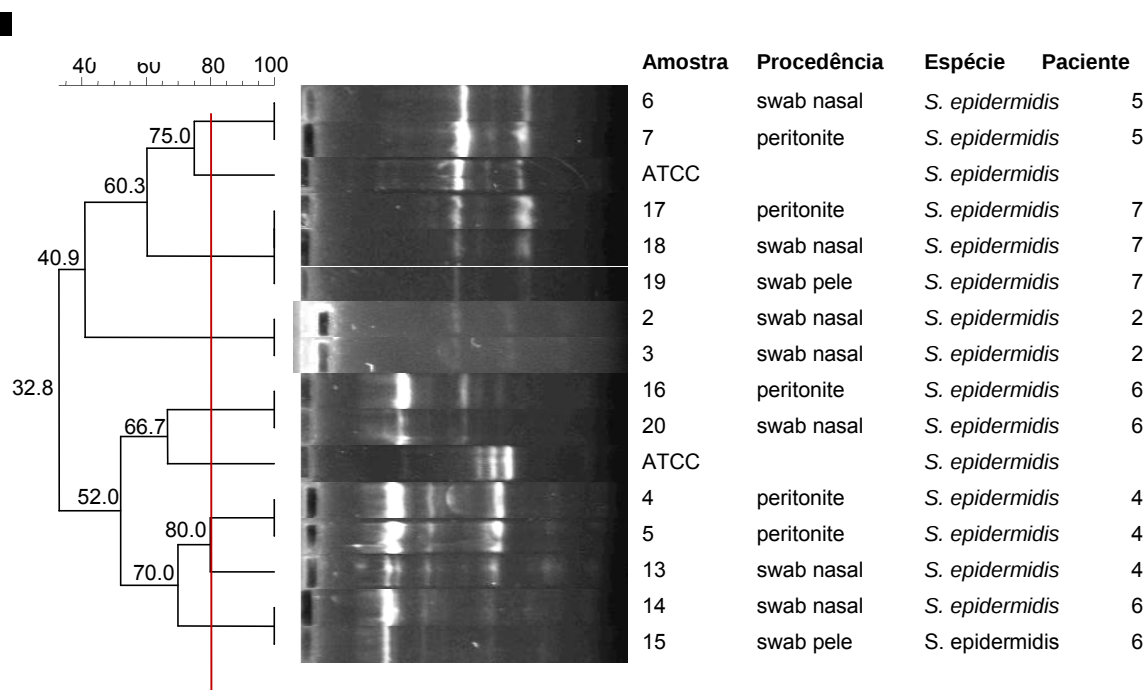
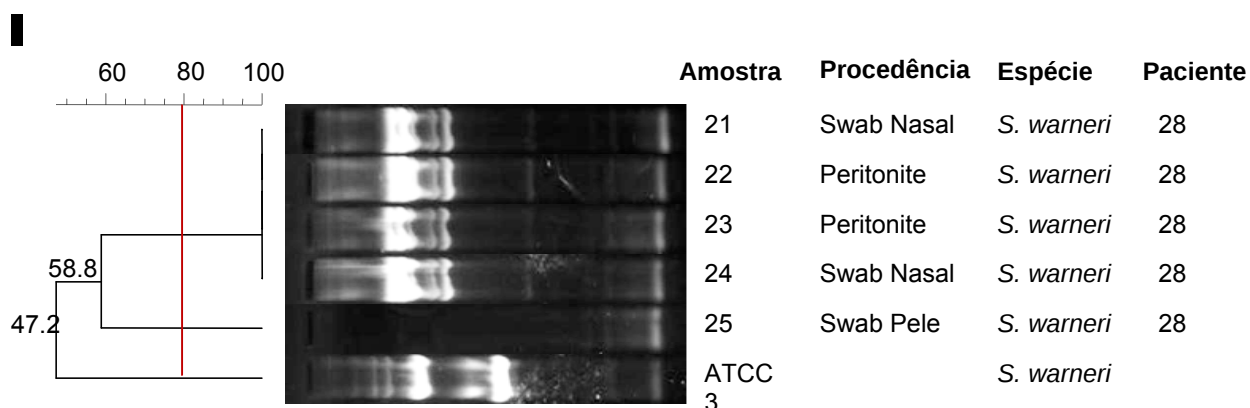


Figura 4: Dendogramas de amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de fossa nasal, pele e líquido peritoneal de pacientes em diálise peritoneal analisadas pelo método de tipagem molecular Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

S. warneri RAPD M13



S. warneri RAPD-7

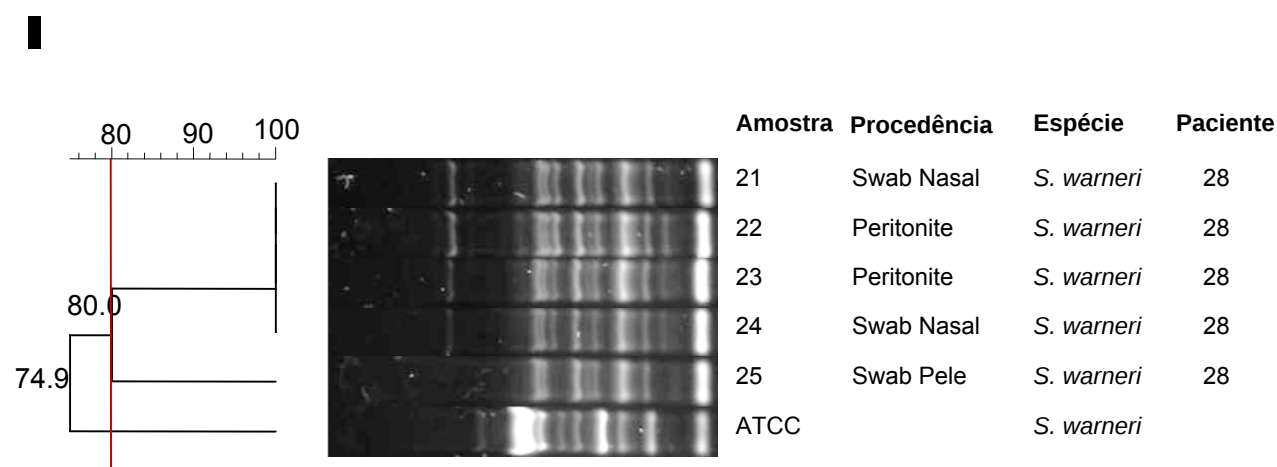


Figura 5: Dendogramas de amostras de *Staphylococcus warneri* isoladas de fossa nasal, pele e líquido peritoneal de pacientes em diálise peritoneal analisadas pelo método de tipagem molecular Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

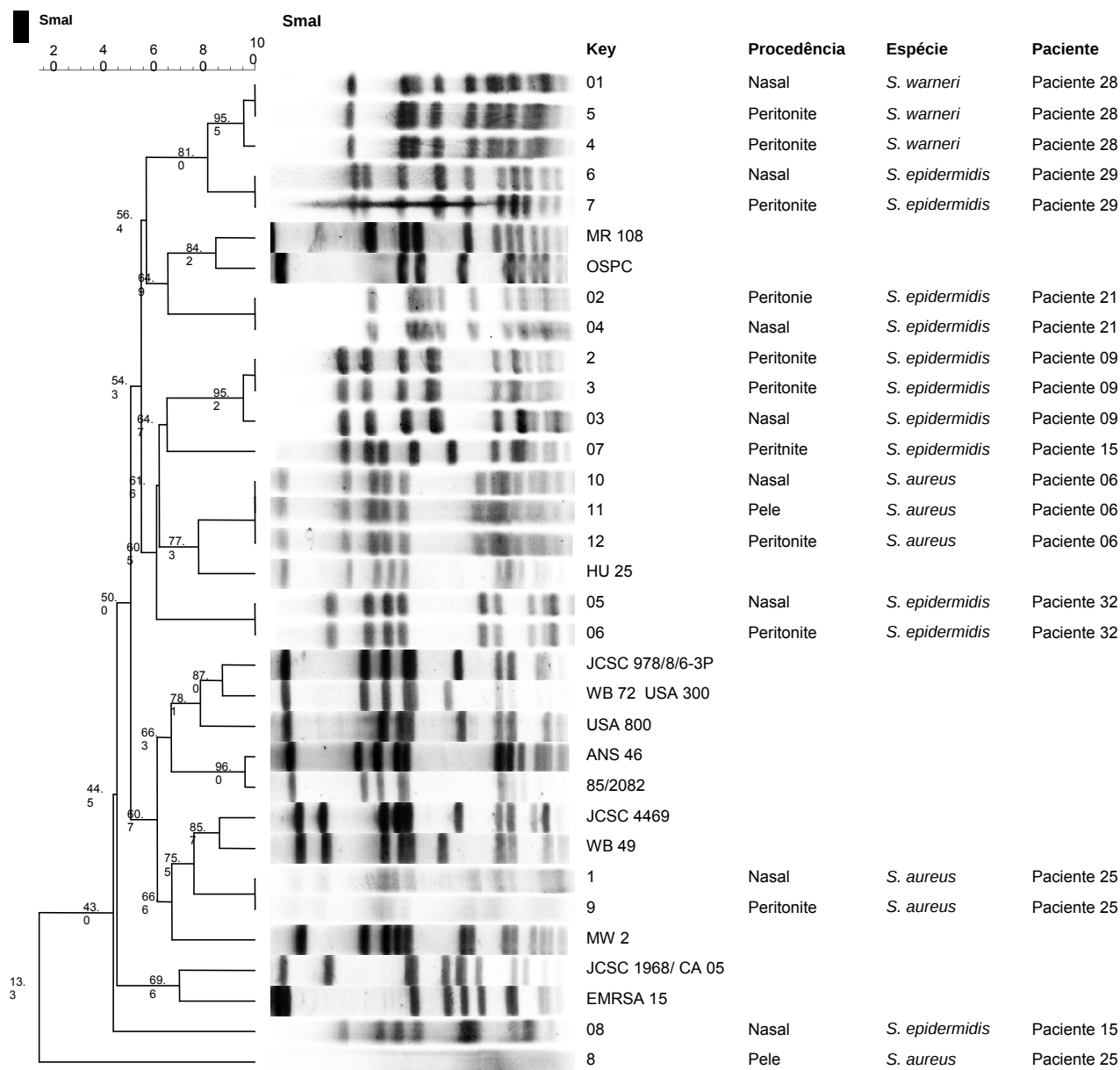


Figura 6: Dendrograma de amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de fossa nasal, pele e líquido peritoneal de pacientes em diálise peritoneal analisadas pela técnica de PFGE gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – Smal

5. DISCUSSÃO

O presente estudo procurou analisar em pacientes submetidos à diálise peritoneal, as propriedades microbiológicas dos *Staphylococcus*, sejam como colonizantes habituais ou agentes responsáveis por infecções, buscando estabelecer associações entre as características dos pacientes e do estado de portador com a ocorrência de infecções, especificamente peritonites e infecção do orifício de saída do cateter de diálise.

A coleta seriada em 32 pacientes permitiu a detecção de 122 linhagens, 16,6% pertencentes à espécie *S. aureus*, 51,2% à *S. epidermidis*, 13,2% de *S. warneri*, 9,9% de *S. haemolyticus*, e 9,1% de outros ECN.

A diversidade do gênero *Staphylococcus* encontrada na cavidade nasal de humanos tem sido abordada por outros autores (KLUYTMANS et al., 1997; COLE et al., 2001; WEIDENMAIER et al., 2012) que se confirmou nesta pesquisa, e assim como outros autores sugerimos não subestimar a prevalência e o papel dos ECN nos pacientes de diálise peritoneal (KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006; PIETTE, VERSCHRAEGEN, 2009).

Das 20 linhagens de *S. aureus* carregadas na fossa nasal, 35% (n=7) resultaram na ocorrência de infecções. Segundo VAN BELKUM et al. (2009^a) a colonização da cavidade nasal tem sido identificada como evidente fator de risco para diversos tipos de infecções, devido ser o *habitat* primário dos *Staphylococcus* spp. nos seres humanos; aproximadamente 24% da população possuem colonização nasal persistente de *S. aureus*, sugerindo a capacidade de internalização do *S. aureus* em células endoteliais, epiteliais, fibroblastos entre outras. Estudo realizado na Alemanha mostrou que a mesma cepa persiste durante meses e até anos, indicando que possuem mecanismos específicos de persistência para determinados ambientes, vencendo os mecanismos imunológicos de defesa do hospedeiro conferindo a espécie dificuldade de detecção, tratamento e aumento na chance de ocorrência e recorrência de infecções (DAESCHLEIN et al., 2006). A colonização significa o estágio de superação de mecanismos fisiológicos de defesa como descamação, produção de muco, lisozima, ácidos gordurosos bactericidas, imunoglobulinas e ativação de sistema complemento,

todas tentativas fisiológicas de eliminação desses agentes colonizantes (WEIDENMAIER et al., 2012).

Devido associação com circunstâncias como hospitalização e quebra da barreira cutânea pelo uso de cateter abdominal, pacientes dialisados tem a prevalência do estado de portador de *S. aureus* aumentada para até 60% (AMATO et al., 2001; NOUWEN et al., 2006). Neste estudo confirmou-se essa frequência, com metade dos pacientes investigados sendo portadores de *S. aureus*.

De acordo com publicação recente de MOTAMEDIFAR et al. (2010), a diferença entre as taxas de prevalência do portador entre vários estudos encontra-se na dependência da coleta, nas diferentes técnicas empregadas para isolamento; isso tem sido discutido em diversas investigações e destaque foi dado não somente a importância de se apresentar as formas de interação bacteriana e as relações com colonização humana, mas também estudando o impacto da persistência do *S. aureus* carregado no aumento do risco de autoinfecção (VAN BELKUM et al., 2009^b).

Em nosso estudo mostrou-se que em pacientes de cor branca conferiu a chance 8,2 vezes maior de ser portador de *S. aureus*. Na série de CESPEDS et al. (2002), avaliando portadores quanto ao perfil profissional como médicos e não médicos, foi verificado uma significativa diferença na cor dos indivíduos, mas também nas diferentes etnias, latinos e asiáticos com diferenças na prevalência de colonização, ressaltaram a dependência da categoria profissional, apesar dos autores sugerirem a possibilidade de fatores genéticos, portanto isso não está claro.

Nesta análise o paciente em diálise peritoneal ao avançar cada ano na idade teve a chance diminuída em 8,6% de ser portador de *S. aureus*. Agregando a esse resultado estudo mexicano avaliou os voluntários saudáveis de uma comunidade que mostrou a taxa de portadores de *S. aureus* como superior naqueles mais jovens se comparado com indivíduos com idade avançada (HAMDAN-PARTIDA et al., 2010). Faltam evidências para esse entendimento em diálise peritoneal uma vez que com o aumento da idade ocorre maior número de situações com quebras de barreiras cutâneas, aumentam as comorbidades, as hospitalizações e exposição aos antimicrobianos.

Entretanto, na presente série mostrou-se que tanto para estado de portador como para ocorrência de infecções, houve consistência quanto à influência da idade,

ocorrendo mais carreadores e maior chance de desenvolver infecções aqueles com menor idade. Segundo (ABU-AISHA et al., 2007), as peritonites foram mais comuns em indivíduos jovens, justificado pelos erros na técnica de diálise, entretanto esses autores não estudaram o papel do carreador nasal.

Neste estudo, também mostramos que diabetes melito aumentou a chance em 3,3 vezes de o paciente ser portador de *S. aureus*. Historicamente, essa é uma das condições que favorece o carreamento de *S. aureus*. Estudos na população em diálise relataram o diabetes melito em associações com portador nasal e subseqüentes infecções (KLUYTMANS et al., 1997; NOUWEN, J. L. et al., 2001; DAESCHLEIN et al., 2006). Mas, outros autores como DURAN et al. (2006) não encontraram associação com as características dos pacientes como idade, sexo e diabetes melito para ser portador de *S. aureus*.

Estudo realizado com 98 pacientes e com alta positividade para *S. aureus* (76%), concluiu que o status de portador foi significativamente associado com aumento do risco de infecção em diálise (NOUWEN et al., 2006). Em hemodiálise, de acordo com DURAN et al. (2006) o portador de *S. aureus* se mantém como o maior fator de risco para infecção. É geralmente aceito que infecções são mais comuns em pessoas diabéticas, embora ainda não seja encontrado um estudo epidemiológico suficientemente representativo que dê suporte satisfatório a este fato, ainda sim, invariavelmente as pesquisas relacionam maior suscetibilidade a infecções com diabetes melito. Nossos resultados não apontaram qualquer correlação entre diabetes melito e ocorrência de infecção.

Considerando as espécies de ECN carreadas pelos pacientes, 13,1% (n=8) de *S. epidermidis* foram associadas com infecções. FRANK et al., (2010) sugeriram que existam três tipos de população microbiana no interior da cavidade nasal, dependendo do estado clínico do portador, primariamente considera que os adultos saudáveis possuem em suas narinas bactérias chamadas de *Actinobacteria* (*Propionibacterium* e *Corynebacterium spp*) em maior proporção e menor freqüência de *Staphylococcus*. Secundariamente, na maioria dos pacientes internados considerados colonizados, o *S. aureus* torna-se a espécie nasal dominante. Em terceiro considera que os pacientes não carreadores de *S. aureus* possuem em sua maioria o *S. epidermidis* como espécie dominante. A proposta dos autores é que fundamentalmente por trás das morbidades

das populações de hospitalizados, pode existir um silencioso estímulo desencadeador de mudanças de microbiotas nasais "saudáveis" para microbiota dominada por *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Questiona-se o quanto uma colonização bacteriana dominada por *S. epidermidis* pode servir de proteção ou estágio intermediário para subseqüentes colonizações nasais por *S. aureus*. Esses autores discutem que a perda de espécies parasitas como a *Propionibacterium acnes*, antes que adquira os *S. epidermidis*, mostrou-se ser determinante fundamental para posterior colonização por *S. aureus*.

Nesta pesquisa 100% dos 32 pacientes apresentaram *Staphylococcus* spp. quando investigados seriadamente para estabelecer o estado de portador, 78,1% (n=25) foram classificados como portadores da espécie *S. epidermidis*, enquanto 65,6% (n=21) apresentavam concomitantemente outros ECN (*S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* e *S. schleiferi*).

Há décadas os ECN são um grupo de bactérias em constante investigação na tentativa de se estabelecer associações entre resistência a antimicrobianos, hospitalizações, produção de fatores de patogenicidade e ocorrência de infecções (MARTINEZ et al., 1997; CUNHA et al., 2006; CHOI et al., 2010). Estudos mostraram que pacientes com AIDS, em uso de próteses e diálise, com colonização nasal por ECN, têm apresentado crescente incidência desses agentes como causa de infecções (SPARE et al., 2003; VON EIFF et al., 2001). Entretanto, em infecções relacionadas à diálise a identificação das diferentes espécies de ECN não é um procedimento da rotina laboratorial devido à complexidade para identificação e discriminação do gênero; desta forma, existe um reduzido número de estudos que relatam associações entre espécies de ECN e o impacto em prognósticos clínicos. Estudar os *Staphylococcus* além da importância epidemiológica mostra-se necessário na compreensão da resistência a antimicrobianos e da patogenicidade (CUNHA et al., 2004^b).

A resistência à oxacilina foi detectada em 20,5% (n=25) de todos os *Staphylococcus* sendo que dos *S. aureus* 5% (n=1) foi resistente à oxacilina e dos ECN 23,5% (n=24) apresentaram resistência à oxacilina. A emergência do MRSA na comunidade tem aumentado, levando a maior alerta para população saudável, mostrando associações quanto ao controle do estado de portador e controle de infecções nosocomiais. Autores sugerem que portadores de MRSA apresentem

maiores risco de desenvolvimento de infecções invasivas, sendo que resistência padrão a meticilina ou oxacilina compreende resistência intrínseca a β -lactâmicos e tetraciclinas, sendo esta multirresistência considerada característica de infecções nosocomial pelo MRSA (KOZIOŁ-MONTEWKA et al., 2006). Neste estudo, linhagens de *S. aureus* de sítios extraperitoneais e da peritonite apresentaram 77,3% de similaridade com a cepa padrão HU 25 pertencente ao CEB com cassete cromossômico mec do Tipo III que é multirresistente e de origem hospitalar, mostrando que cepas de origem nosocomial estão se disseminando para interior de ambientes comunitários, sugerindo que infecções de pessoas da comunidade que necessitam de algum tipo de acompanhamento terapêutico hospitalar como diálise peritoneal, devam ser reavaliadas quanto a classificação de procedência da infecção. (MA et al., 2002; MARTINS, CUNHA, 2007; LU et al., 2008).

Nesta casuística o risco de infecção nos pacientes portadores de espécies dos *Staphylococcus* revelou que o estado de portador de *S. aureus* influenciou com aumento de 11 vezes na ocorrência de infecções. De acordo com FRANK et al. (2010), colonização por *S. aureus* é um significativo fator de predisposição para infecções subseqüentes e para entendimento sobre habitat natural e colonização, a partir do qual originam-se estratégias na prevenção de infecções. NOUWEN et al., (2005) avaliando infecções em diálise peritoneal mostrou que a persistência da colonização por *S. aureus* possui associação com aumento da ocorrência de infecções. (SAXENA, PANHOTRA, 2003) avaliando pacientes hemodialisados mostraram que portadores de *S. aureus* podem apresentar maior risco de desenvolvimento de septicemia relacionado ao acesso vascular associado a *S. aureus* endógeno. (LAI et al., 2011) consideram que portadores de MRSA têm alto risco para subseqüentes ocorrências de episódios de infecção por *S. aureus*.

Quanto a fatores clínicos e epidemiológicos de pacientes portadores de *Staphylococcus* spp., este estudo mostrou que em paciente do sexo feminino a chance foi nove vezes maior ($p=0,06$) na ocorrência de infecção, diferentemente de outros estudos onde autores não apontam o risco de infecção quanto ao gênero. Tanto AMATO et al. (2001) como NOUWEN et al. (2006) não encontraram essa diferença entre os sexos na influência de infecção relacionada à diálise peritoneal, mas, NESSIM et al. (2009) mostraram em diálise peritoneal que mulheres têm risco aumentado de

ocorrências de peritonites se comparado ao sexo masculino, entretanto, com significativa interação com presença de diabetes melito, segundo esses autores a morbidade está associada com aumento da incidência de peritonites por Gram-positivos como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Com relação à patogenicidade da bactéria para ocorrência de infecção, consideramos relevante destacar que a produção de biofilme mostrou um aumento em 5,3 vezes na chance de ocorrência de infecção nos pacientes portadores de ECN, apesar deste dado não ter atingido a significância estatística ($p=0,06$), possivelmente influenciada pelo tamanho da amostra; estudos associam peritonites recorrentes e formação de biofilme.

Em pacientes pediátricos, a avaliação *in vitro* revelou que 50% dos ECN e 14% dos *S. aureus* são resistentes a metilina (WARADY et al., 2007). Recidivas de peritonites podem ocorrer em 20% dos episódios por inatividade de antibióticos frente às bactérias Gram-positivas, considera-se que o microrganismo causador mais comum são os ECN por formação de biofilme, criando condições de sobrevivência aos antimicrobianos dada por uma proteção de fibrinas adesivas originando uma matriz protetora na superfície de cateteres, sendo muitas vezes necessário remoção e reinserção do cateter principalmente em casos de infecção concomitante no orifício de saída e túnel (CHADHA et al., 2010).

De acordo com VAN BELKUM et al. (2009^b) diferentes técnicas fenotípicas e genotípicas usadas para tipagem bacteriana tem sido investigadas e viabilizadas como métodos para diferenciação de espécies, cepas e reconhecimento de clones em determinado meio ambiente. Os diferentes tipos de métodos empregados a exemplo são testes de susceptibilidade a antibióticos, tipagem com vírus bacteriófagos, eletroforeses com enzimas, e recentemente as técnicas de tipagem molecular. TENOVER et al. (1994) em estudo para comparação de métodos moleculares para a tipificação de isolados de *Staphylococcus aureus* apresentou alguns padrões para validade de técnicas moleculares, como reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade no uso e na interpretação das técnicas, além disso, uma intensidade maior das bandas pode auxiliar na interpretação dos resultados. No presente estudo as

técnicas RAPD-PCR e PFGE apresentaram um relevante poder discriminatório, pois diferenciaram as amostras estudadas das cepas ATCC e de isolados não relacionados.

O PFGE é o mais frequente método usado para tipagem de *Staphylococcus*, sendo considerado padrão ouro devido ao seu caráter discriminatório e reprodutibilidade (TENOVER et al., 1994). Em nosso estudo dos oito pacientes que evoluíram com peritonites em 87,5% (n=7) apresentaram similaridade de 95% a 100% entre as linhagens dos portadores e as associadas com a infecção, com essa técnica a propagação das linhagens foi devidamente caracterizada na população estudada.

Por fim, o protocolo para caracterização do estado de portador com três de coletas e usando como critério de similaridade o método de susceptibilidade com técnica de difusão da droga em ágar (Método Kirby-Bauer), permitiu avaliar prospectivamente linhagens isoladas de sítios carregados, mas também dos sítios infectados e a isso acrescentar conhecimentos clínicos e microbiológicos no fator de risco do portador nasal para infecções relacionadas à diálise peritoneal. Apesar de reconhecermos limitações deste estudo clínico por ser em um único centro de diálise peritoneal, pelo pequeno número de pacientes (CARAMORI, 2011) que completaram o seguimento proposto e o reduzido número de desfechos infecciosos.

6. CONCLUSÃO

Desde o passado os portadores nasais de *Staphylococcus* spp. têm sido estudados como fator de risco para infecções em diversas circunstâncias. O maior progresso tem sido na compreensão da interação entre *S. aureus* e seu hospedeiro. Assim como na literatura, nossos resultados mostram que colonização nasal por *S. aureus* é um processo multifatorial; em diálise peritoneal nós mostramos influencia de fatores intrínsecos da bactéria e do hospedeiro. A cor branca e o diabetes melito aumentaram a chance do paciente ser portador, ao passo que o avançar da idade e o tempo em diálise diminuíram essa chance. A menor idade foi um fator relevante para às ocorrências de infecções, como também para um maior tempo livre sem essas complicações. Assim, esta série sugere que o jovem tem risco tanto quanto o paciente em idades avançadas. Em consideração aos fatores microbiológicos, o estudo apontou que a produção de fatores de patogenicidade das bactérias atua como fatores de risco para infecção, nossos resultados sugeriram que lecitinase e possivelmente biofilme tem importante papel na ocorrência de infecções. Com este estudo esperamos contribuir com novas e efetivas investigações abordando fatores clínicos, demográficos, microbiológicos e moleculares de forma independentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-AISHA, H. et al. Rates and causes of peritonitis in a National Multicenter Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis program in Sudan: first-year experience. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 18, n. 4, p. 565-70, Nov 2007.

AMATO, D. et al. Staphylococcal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: colonization with identical strains at exit site, nose, and hands. **Am J Kidney Dis**, v. 37, n. 1, p. 43-48, Jan 2001.

AMMENDOLIA, M. G. et al. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 10, p. 3235-8, Oct 1999.

ARSLAN, S.; OZKARDES, F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 29-33, Feb 2007.

BAKER, J. S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **J Clin Microbiol**, v. 19, n. 6, p. 875-9, Jun 1984.

BARBIER, F. et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis**, v. 202, n. 2, p. 270-81, Jul 15 2010.

BARRETTI, P. et al. Peritonitis in Latin America. **Perit Dial Int**, v. 27, n. 3, p. 332-9, May-Jun 2007.

BATALHA J. E. N., C. J. C. T., CORRENTE J. E., MONTELLI A. C., BARRETTI P., CUNHA M. L. R. S. . Risk of peritonitis during peritoneal dialysis in carriers of *staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 578-594, Nov 30, 2006.

BATALHA JEN, C. M., MONTELLI AC, BARRETI P, CARAMORI JCT. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* from home-treated peritoneal dialysis patients. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.**, v. 16, n. 2, p. 212-222, May 30 2010.

BAZZATO, G. et al. A new technique of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD): double-bag system for freedom to the patient and significant reduction of peritonitis. **Clin Nephrol**, v. 13, n. 6, p. 251-4, Jun 1980.

BUONCRISTIANI U, B. P., COZZARI M, CAROBI C, QUINTALIANI G, BARBAROSSA D. A new safe simple connection system for CAPD. **Int J of Neph Urol & Androl.** , v. 1, p. 50-53, 1980.

CARAMORI, J. C. T. Vinte anos em diálise peritoneal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu **TESE (DOUTORADO)**, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu., 2011.

CESPEDES, C. et al. Differences between *Staphylococcus aureus* isolates from medical and nonmedical hospital personnel. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2594-7, Jul 2002.

CHADHA, V.; SCHAEFER, F. S.; WARADY, B. A. Dialysis-associated peritonitis in children. **Pediatr Nephrol**, v. 25, n. 3, p. 425-40, 2010.

CHOI, S. H. et al. Incidence, characteristics, and outcomes of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 3346-9, 2010.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect Immun**, v. 37, n. 1, p. 318-26, Jul 1982.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21 st information supplement. **M100-S18**, Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COLE, A. M. et al. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1064-9, Nov 2001.

CORRIGAN, R. M. et al. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 8, p. 2435-46, Aug 2007.

CUNHA MDE, L.; RUGOLO, L. M.; LOPES, C. A. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 661-8, Sep 2006.

CUNHA MDE, L.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. V. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 855-60, Dec 2004. (a)

CUNHA MDE, L. et al. Significance of slime as virulence factor in coagulase-negative staphylococcus peritonitis in CAPD. **Perit Dial Int**, v. 24, n. 2, p. 191-3, Mar-Apr 2004. (b)

DAESCHLEIN, G. et al. Risk factors for *Staphylococcus aureus* nasal carriage in residents of three nursing homes in Germany. **J Hosp Infect**, v. 63, n. 2, p. 216-20, Jun 2006.

DAY, N. P. et al. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 292, n. 5514, p. 114-6, Apr 6 2001.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 16-34, table of contents, Jan 2000.

DOEBBELING, B. N. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in healthcare workers. **J Chemother**, v. 6 Suppl 2, p. 11-7, Apr 1994.

DURAN, N.; OCAK, S.; ESKIOCAK, A. F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among the diabetic and non-diabetic haemodialysis patients. **Int J Clin Pract**, v. 60, n. 10, p. 1204-9, Oct 2006.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*, 2011. Disponível em :<<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Last full update: January 18, 2012, Acesso em: 10 Dez. 2012.

FERENS, W. A.; BOHACH, G. A. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. **J Lab Clin Med**, v. 135, n. 3, p. 225-30, Mar 2000.

FRANK, D. N. et al. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10598, 2010.

HAMDAN-PARTIDA, A.; SAINZ-ESPUNES, T.; BUSTOS-MARTINEZ, 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**, v. 48, n. 5, p. 1701-5, May 2010.

HILDEBRAND, A. et al. Peritonitis and exit site infections in First Nations patients on peritoneal dialysis. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 11, p. 1988-95, Nov 2010.

KIRMANI, N. et al. *Staphylococcus aureus* carriage rate of patients receiving long-term hemodialysis. **Arch Intern Med**, v. 138, n. 11, p. 1657-9, Nov 1978.

KLEEMAN, K. T.; BANNERMAN, T. L.; KLOOS, W. E. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 5, p. 1318-21, May 1993.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin Microbiol Rev**, v. 7, n. 1, p. 117-40, Jan 1994.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **J Clin Microbiol**, v. 1, n. 1, p. 82-8, Jan 1975.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 3, p. 505-20, Jul 1997.

KOZIOL-MONTEWKA, M. et al. The investigation of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci nasal carriage among patients undergoing haemodialysis. **Microbiol Res**, v. 161, n. 4, p. 281-7, 2006.

KRISTINSSON, K. G.; SPENCER, R. C.; BROWN, C. B. Clinical importance of production of slime by coagulase negative staphylococci in chronic ambulatory peritoneal dialysis. **J Clin Pathol**, v. 39, n. 1, p. 117-8, Jan 1986.

LAI, C. F. et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with higher all-cause mortality in hemodialysis patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 1, p. 167-74, Jan 2011.

LIDUMA, I. et al. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Medicina (Kaunas)**, v. 48, n. 6, p. 305-9, 2012.

LU, P. L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage, infection and transmission in dialysis patients, healthcare workers and their family members. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, n. 5, p. 1659-65, May 2008.

LYYTIKAINEN, O. et al. Evaluation of clinical and laboratory findings in leukaemic patients with blood cultures positive for *Staphylococcus epidermidis*. **J Hosp Infect**, v. 38, n. 1, p. 27-35, Jan 1998.

MA, X. X. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 4, p. 1147-52, Apr 2002.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, v. 248, n. 4959, p. 1066, Jun 1 1990.

MARTINEZ, J. A. et al. Risk factors for oxacillin/methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J Hosp Infect**, v. 35, n. 4, p. 295-9, Apr 1997.

MARTINS, A.; CUNHA MDE, L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 9, p. 787-95, 2007.

MCDUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5113-20, Nov 2003.

MOTAMEDIFAR, M.; HASSANZADEH, P.; GHAFARI, N. Relative frequency of Staphylococcal carriage and antibiotic sensitivity of isolated Staphylococci in hemodialysis patients in Shiraz, Iran. **Med Princ Pract**, v. 19, n. 5, p. 379-83, 2010.

NESSIM, S. J. et al. Predictors of peritonitis in patients on peritoneal dialysis: results of a large, prospective Canadian database. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 7, p. 1195-200, Jul 2009.

NOUWEN, J. et al. *Staphylococcus aureus* carriage patterns and the risk of infections associated with continuous peritoneal dialysis. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 2233-6, Jun 2006.

NOUWEN, J. L. et al. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. **Kidney Int**, v. 67, n. 3, p. 1084-92, Mar 2005.

NOUWEN, J. L.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. **Neth J Med**, v. 59, n. 3, p. 126-33, Sep 2001.

OREOPOULOS, D. G. et al. A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). **Trans Am Soc Artif Intern Organs**, v. 24, p. 484-9, 1978.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 555-67, Aug 2009.

PFALLER, M. A.; HERWALDT, L. A. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 3, p. 281-99, Jul 1988.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Vet Microbiol**, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, Feb 16 2009.

PIGNATARI, A. et al. *Staphylococcus aureus* colonization and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 9, p. 1898-902, Sep 1990.

POPOVICH, R. P.; MONCRIEF, J. W.; NOLPH, K. D. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Artif Organs**, v. 2, n. 1, p. 84-6, Feb 1978.

SAXENA, A. K.; PANHOTRA, B. R. The Prevalence of Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Associated Vascular Access-Related Septicemia Among Patients on Hemodialysis in Al-Hasa Region of Saudi Arabia. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 14, n. 1, p. 30-8, Jan-Mar 2003.

SCHAUBEL, D. E.; BLAKE, P. G.; FENTON, S. S. Trends in CAPD technique failure: Canada, 1981-1997. **Perit Dial Int**, v. 21, n. 4, p. 365-71, Jul-Aug 2001.

SESSO, R. et al. *Staphylococcus aureus* skin carriage and development of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Clin Nephrol**, v. 31, n. 5, p. 264-8, May 1989.

SEWELL, C. M. et al. Staphylococcal nasal carriage and subsequent infection in peritoneal dialysis patients. **JAMA**, v. 248, n. 12, p. 1493-5, Sep 24 1982.

SPARE, M. K. et al. Genotypic and phenotypic properties of coagulase-negative staphylococci causing dialysis catheter-related sepsis. **J Hosp Infect**, v. 54, n. 4, p. 272-8, Aug 2003.

STECKELBERG, J. M. et al. Lack of extracellular slime effect on treatment outcome of *Staphylococcus epidermidis* experimental endocarditis. **J Antimicrob Chemother**, v. 23, n. 1, p. 117-21, Jan 1989.

TENOVER FC, A. R., ARCHER G, BIDDLE J, BYRNE S, GOERING R, HANCOCK G, HÉBERT GA, HILL B, HOLLIS R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v. 32, p. 407-415, 1994.

TUAZON, C. U. et al. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. **JAMA**, v. 231, n. 12, p. 1272, Mar 24 1975.

VAN BELKUM, A. et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 1, p. 32-47, Jan 2009. (b)

VAN BELKUM, A. et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. **J Infect Dis**, v. 199, n. 12, p. 1820-6, Jun 15 2009. (a)

VANDENBERGH, M. F.; VERBRUGH, H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. **J Lab Clin Med**, v. 133, n. 6, p. 525-34, Jun 1999.

VON EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. **N Engl J Med**, v. 344, n. 1, p. 11-6, Jan 4 2001.

WANG, I. K. et al. Bacteremia in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. **Intern Med**, v. 51, n. 9, p. 1015-21, 2012.

WARADY, B. A. et al. Peritonitis in children who receive long-term peritoneal dialysis: a prospective evaluation of therapeutic guidelines. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 7, p. 2172-9, Jul 2007.

WEIDENMAIER, C.; GOERKE, C.; WOLZ, C. *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. **Trends Microbiol**, v. 20, n. 5, p. 243-50, May 2012.