

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE
***Staphylococcus aureus* ISOLADO EM MANAUS- AMAZONAS**

MARIA AUXILIADORA NEVES DE CARVALHO

MANAUS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

MARIA AUXILIADORA NEVES DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE
***Staphylococcus aureus* ISOLADO EM MANAUS- AMAZONAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em saúde, diagnóstico molecular.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Co- Orientador: Prof.Dr. Adolfo José da Mota

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C331c Carvalho, Maria Auxiliadora Neves de
Caracterização epidemiológica e molecular de Staphylococcus aureus isolado em Manaus - Amazonas / Maria Auxiliadora Neves de Carvalho. 2016
160 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Staphylococcus aureus. 2. S. aureus MRSA. 3. S. aureus MSSA. 4. mecA. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

MARIA AUXILIADORA NEVES DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO
***Staphylococcus aureus* ISOLADO EM MANAUS- AMAZONAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em saúde, diagnóstico molecular.

Qualificação da Tese: _29____/_02____/_2016_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho - (Presidente)

Prof. Dr. Luis Fernando de Souza Passos – (UFAM)

Prof. Dr. Luis Andre Moraes Mariuba – (UFAM)

Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva – (UFAM)

Profa. Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho – (UFAM)

Pelo carinho,

Paciência,

Companheirismo,

Incentivo e

Apoio

Ao meu esposo Flavio

E aos meus filhos

Bruna

Julio

e

Marcelo .

Ofereço.....

Ao meu amado pai e mãe que sempre me
estimularam a estudar e me apoiaram em tudo, e a
minha irmã Sonia dedico.....

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Spartaco

Astolfi Filho e co-orientador Professor Dr. Adolfo

José da Mota pelas orientações, estímulo,

ensinamentos e apoio, sem os quais jamais teria

conseguido ir em frente e concluído esse trabalho

que considero de extrema relevância para a

medicina.

Quero agradecer também a Dra. Rose Mary
Correa Santos (Bioquímica) e ao meu amigo
André (assistente de laboratório), que foram
indispensáveis e fundamentais para a
realização desse trabalho.

.

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.

Roberto Shinyashiki

Lista de Figuras

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figura 2: Estrutura da parede celular do <i>S. aureus</i>	27
Figura 3: Impetigo Pustular.....	32
Figura 4: Hordéolo... ..	32
Figura 5: Abscesso Inguinal.	33
Figura 6: Ferida cirúrgica infectada (Colostomia) por <i>S. aureus</i>	34
Figura 7: Quadro Pneumonia Estafilocócica.....	36
Figura 8: Recém-nascido em choque séptico.	38
Figura 9: Síndrome do Choque Tóxico..	38
Figura 10: Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica.	41
Figura 11: Fatores de virulência do <i>S. aureus</i>	47
Figura 12: Diagrama esquemático ilustrando como <i>S. aureus</i> adquire resistência à meticilina e sua capacidade de expressar diferentes fatores de virulência.	49
Figura 13: Evolução da infecção por <i>S. aureus</i>	53
Figura 14: Teste da coagulase em ágar-sangue....	59
Figura 15: Cronograma de resistência do <i>S. aureus</i>	63
Figura 16: Distribuição por gênero da população com cultura positiva para <i>S. aureus</i> para os Grupos A (2005) e B (2010).	73
Figura 17: Distribuição por faixa etária da população com cultura positiva para <i>S. aureus</i> para os Grupos A (2005) e B (2010).	74
Figura 18: Distribuição dos pacientes com cultura positiva para <i>S.aureus</i> do Grupo A (2005)....	74
Figura 19: Incidência de cepas MRSA e MSSA entre os pacientes com cultura positiva para <i>S. aureus</i> para os Grupos A e B.....	79
Figura 20: Perfil eletroforético de amplicons das cepas MSSA em gel de agarose 2%.	82
Figura 21: Perfil eletroforético de amplicons das cepas MRSA em gel de agarose 2%.	83
Figura 22: Análise filogenética das amostras MSSA pelo método de Máxima Semelhança.....	84

Figura 23: Análise filogenética das amostras MRSA pelo método de Máxima Semelhança.....	85
Figura 24: Análise filogenética das amostras MRSA pelo método de Máxima Semelhança.....	86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais grupos de toxinas expressas por <i>S. aureus</i>	45
Tabela 2: Iniciadores usados nesse trabalho.....	72
Tabela 3: Distribuição por tipo de doença da população com cultura positiva para <i>S. aureus</i> para os Grupos A (2005) e B (2010).....	75
Tabela 4: Distribuição por porta de entrada da população com cultura positiva para <i>S. aureus</i> para os grupos A e B.	75
Tabela 5: Resultado do antibiograma dos pacientes com cultura positiva para <i>S.aureus</i> , grupo A.	76
Tabela 6: Resultado do antibiograma dos pacientes com cultura positiva para <i>S. aureus</i> , grupo B.	77
Tabela 7: Distribuição segundo a incidência de óbito de pacientes com cultura positiva para o <i>S. aureus</i> MRSA, grupos A e B.	77
Tabela 8: Tabela de Análise Molecular das cepas MSSA.....	80
Tabela 9: Tabela de Análise Molecular das cepas MRSA	81

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
JUSTIFICATIVA.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. MICRO-ORGANISMOS E ANTIMICROBIANOS, UMA HISTÓRIA COM VÁRIOS CAPÍTULOS.....	20
1.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	24
1.2.1. PAREDE CELULAR.....	26
1.2.2. PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE.....	27
1.3. A DOENÇA ESTAFILOCÓCICA.....	28
1.3.1. DOENÇAS CAUSADAS POR S.AUREUS.....	30
1.3.1.1. INFECÇÕES CUTÂNEAS E DO TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO.....	31
1.3.1.1.1. IMPETIGO.....	31
1.3.1.1.2. FOLICULITE.....	32
1.3.1.1.3. FURÚNCULO OU ABSCESSO.....	33
1.3.1.1.4. CARBÚNCULO.....	33
1.3.1.1.5. INFECÇÃO HOSPITALAR.....	33
1.3.1.2. INFECÇÕES SISTÊMICAS.....	34
1.3.1.2.1. BACTEREMIAS.....	34
1.3.1.2.2. ENDOCARDITES.....	35
1.3.1.2.3. PNEUMONIA E EMPIEMA.....	35
1.3.1.2.3. OSTEOMIELITES.....	36
1.3.1.2.3. CHOQUE SÉPTICO.....	37
1.3.1.3. QUADROS TÓXICOS.....	37
1.3.1.3.1. SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO.....	37
1.3.1.3.2. INTOXICAÇÃO ALIMENTAR.....	38
1.3.1.3.3. SÍNDROME DA PELE ESCALDADA.....	40

1.4. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA ESTAFILOCÓCICA.....	42
1.5. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	44
1.5.1. TOXINAS.....	44
1.5.2. ENZIMAS, ELEMENTOS GENÉTICOS E OUTROS COMPONENTES BACTERIANOS.....	46
1.6. PATOGÊNESE DA DOENÇA ESTAFILOCÓCICA.....	52
1.6.1. INFECÇÃO INVASIVA SISTÊMICA.....	55
1.6.2. TOXINAS MEDIANDO DOENÇAS.....	56
1.7. RESPOSTA DO HOSPEDEIRO A INFECÇÃO.....	56
1.8. DIAGNÓSTICO.....	57
1.8.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	57
1.8.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	58
1.8.2.1. CULTURA E ANTIBIOGRAMA.....	58
1.8.2.2. TESTES BIOQUÍMICOS.....	59
1.8.2.3. MÉTODOS MOLECULARES.....	59
1.8.2.4. EXAMES INESPECÍFICOS.....	61
1.9. TRATAMENTO.....	61
1.10. PREVENÇÃO.....	65
2. OBJETIVOS.....	66
2.1. GERAL.....	66
2.2. ESPECÍFICOS.....	66
3. METODOLOGIA.....	67
3.1. MODELO DE ESTUDO.....	67
3.2. UNIVERSO DE ESTUDO.....	67
3.2.1. PARTICIPANTES.....	67
3.2.2. AMOSTRAS.....	67
3.2.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	68
3.3. COLETA E PURIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	68
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69

3.5. GENÉTICA MOLECULAR.....	70
3.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA DAS LINHAGENS BACTERIANAS.....	70
3.5.2. AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE MENOR DO GENE 16S POR PCR E SEQUENCIAMENTO.....	71
4. RESULTADOS.....	73
4.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS.....	73
4.2. PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	75
4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	78
4.4. AMPLIFICAÇÃO DO GENE MEC A.....	82
4.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	83
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÃO.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8. ANEXOS.....	113
8.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	113
8.2. QUESTIONÁRIO.....	116
8.3. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	118
8.4. TABELA DE IDADES.....	119
8.5. MANUSCRITO 1.....	120
8.6. MANUSCRITO 2.....	142

RESUMO

As infecções hospitalares causadas por diversos micro-organismos tem sido um enorme desafio enfrentado pela medicina desde sempre. Dentre esses, *Staphylococcus aureus* lidera todas as estatísticas tanto de infecções quanto de complicações e morbimortalidade. Tal capacidade é atribuída à expressão de um sofisticado sistema de defesa que confere, entre outros fatores, resistência até mesmo aos antibióticos mais eficazes. Manaus-AM não difere dos outros grandes centros do Brasil e do mundo, porque tem sido cada vez mais frequente a identificação de cepas resistentes, isoladas em hospitais da capital amazonense. Tendo em vista esse quadro extremamente preocupante para os serviços de saúde, é necessário (1) delinear a etiopatogenia das infecções hospitalares e a epidemiologia do *S. aureus*, (2) acompanhar a evolução dos mecanismos de resistência, para subsidiar as decisões médicas na definição do tratamento mais adequado e (3) criar um protocolo de identificação dos isolados e perfil de resistência em um período de no máximo 24 horas. O objetivo desse trabalho é relatar os achados epidemiológicos e do espectro de resistência do *S. aureus*, obtido mediante 2 estudos transversais com intervalo de cinco anos, envolvendo 113 pacientes, todos com cultura positiva para *S. aureus* e discutir a problemática da identificação em nível de espécie, bem como do mecanismo de resistência aos antibióticos. Observou-se um aumento da frequência de infecções por cepas MRSA de 47,3% para 96,6%, um resultado alarmante. Em conjunto esses resultados confirmam a necessidade de medidas urgentes de controle das cepas multi resistentes de *S. aureus* o que contribuirá de forma profilática às infecções hospitalares e também subsidiará o médico nos casos submetidos à antibioticoterapia.

PALAVRAS CHAVES: *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, mecA.

ABSTRACT

Nosocomial infections caused by various microorganisms have been a huge challenge for the medicine. Among these microorganisms, *Staphylococcus aureus* leads all statistics of infections and also complications and morbimortality. This capability is attributed to the expression of a sophisticated defense system that provides resistance, among other factors, even to the most effective antibiotics. Manaus-AM does not differ from other large centers in Brazil and the world, because resistant strains have been identified frequently in this city. In a view of this worrying scenario for medicine, it is necessary to (1) delineate the pathogenesis of nosocomial infections and the epidemiology of *S. aureus*, (2) monitoring the development of resistance mechanisms, to support medical decisions in defining the treatment more adequate and (3) creating one protocol to the identification of isolates and resistance profile in a period up to 24 hours. This study describes the *S. aureus* resistance spectrum, obtained by two studies with an interval of five years, involving 113 patients and discusses the problem of the mechanism of the antibiotic resistance. We observed an increased frequency of infections caused by MRSA strains 47.3% to 96.6%. The increase of the MRSA strains is alarming. These results confirm the need for urgent control policy of the multi-resistant strains of *S. aureus* which will help prophylactically to hospital infections and also will subsidize the medical body in cases of antibiotic therapy.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, *mecA*.

JUSTIFICATIVA

O aumento da incidência de infecções por *Staphylococcus aureus* tem sido destaque em diferentes publicações nos últimos anos principalmente pela diminuição progressiva do perfil de sensibilidade aos diferentes antimicrobianos, o que tem levado a verdadeiros dilemas terapêuticos na prática clínica.

O número de pesquisas para descoberta de novos antibióticos diminuiu sobremaneira nos últimos anos, enquanto que a resistência às drogas antimicrobianas cresceu de forma assustadora.

Atualmente *S. aureus* é considerado um dos micro-organismos mais importantes na prática médica e apontado como responsável pelas Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) (NEWSON et al., 2008 e CORREAL et al., 2013).

Dados do National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) mostram que o *S. aureus* MRSA foi o responsável por 59,5% das infecções em Unidades de Terapia Intensiva de vários hospitais dos EUA (2006-2007), (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Ainda nos EUA, em 2011, o número de pacientes com infecções por MRSA foi de 80.461, e desses 11.285 pacientes foram a óbito (OLIVEIRA et al., 2014).

No Brasil, o isolamento de *S. aureus* e sua relação com infecções relacionadas à assistência à saúde atingem valores altíssimos. Em vários hospitais brasileiros, o isolamento de *S. aureus* MRSA varia de 30 a 80 % (SHORE et al., 2011 e OLIVEIRA et al., 2014).

Várias publicações mostram índices de mortalidade indiscutivelmente mais altos em pacientes que desenvolveram bacteremia por *S.aureus* Meticilina (Oxacilina) – Resistentes (MRSA) que por *S. aureus* Meticilina (Oxacilina) - Sensíveis (MSSA), além disso, existe o aumento de custos associado à hospitalização prolongada, necessidade de

antimicrobianos mais caros e gastos indiretos com medidas de controle de infecção (OLIVEIRA et al., 2014).

Até meados de 1996 todas as cepas de MRSA eram universalmente sensíveis à vancomicina, o primeiro *S. aureus* com resistência intermediária a Vancomicina (MIC 4-8 microgramas / mL⁻¹) foi descrito por Hiramatsu no Japão em 1997 (HOWDEN et al., 2010).

Em 2002, foi descrito o primeiro *S. aureus* com resistência total a vancomicina em Michigan, EUA e até 2003, três cepas já haviam sido descritas com a presença do gene vanA responsável por esse fenótipo (ROSSI e ANDREAZZI, 2005). A partir de então relatos de resistência vem sendo descritos mais e mais em todo o planeta, inclusive com o aparecimento de clones de resistência de MRSA, agora não mais restritos ao ambiente hospitalar, mas presentes também na comunidade.

Várias tentativas já foram feitas para desenvolver uma vacina contra esta bactéria, mas até o momento os resultados não são satisfatórios, assim, a terapia com antibióticos ainda é a principal estratégia no combate a infecções por *S. aureus*. E a pergunta que fica é: até quando poderemos lançar mão dessa ferramenta? Se a cada dia o *S. aureus* parece desenvolver novos mecanismos capazes de driblar todas as armas criadas pelo homem.

Em Manaus – Amazonas, existe poucos estudos mostrando o percentual de incidência, o grau de resistência e o comportamento das cepas resistentes de *S. aureus*, assim sendo, o presente estudo faz uma colaboração relevante ao alertar as autoridades para a necessidade de criação de um programa ou políticas públicas com estratégias bem definidas de vigilância das cepas resistentes para tentar evitar sua propagação.

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um desafio para profissionais que se dedicam à área da saúde, graças a sua alta incidência nas infecções hospitalares e ao seu espectro de resistência aos mais diferentes antibióticos usados na prática médica diária, desde a Penicilina e as Meticilinas (particularmente a oxacilina), até a Vancomicina. Com isso, o indivíduo que possui essa bactéria em sua microbiota, de forma permanente ou transitória, torna-se refém em potencial desta astuciosa bactéria que transita de comensal à patogênica, aproveitando falhas nas defesas do hospedeiro e assim, consegue adentrá-lo e causar todo seu malefício.

Médicos, biólogos moleculares, bioquímicos, biomédicos e microbiologistas, buscam formas de identifica-lo precocemente e elimina-lo, entretanto, ao que parece todo avanço é rapidamente tornado sem efeito por novos isolados mais resistentes e versáteis. O problema é mundial e as estatísticas são assustadoras e preocupantes em se pensando no futuro. Os dados epidemiológicos em Manaus são poucos, mas na prática clínica a gravidade das formas clínicas e o nível de resistência encontrado entre as cepas circulantes na capital amazonense motivaram o presente estudo, mais detalhado e aprofundado, para eventualmente nortear políticas públicas, práticas profiláticas e terapêuticas em Manaus - AM.

De Abril a Outubro de 2005 realizamos uma pesquisa clínica que identificou 55 pacientes com cultura positiva para *S. aureus* no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV), essa pesquisa foi desenvolvida através de um estudo prospectivo observacional que revelou um elevado percentual de resistência para Penicilina (92,3%) e Oxacilina (61,5%) e todos os isolados foram sensíveis à Vancomicina. Dos 55 pacientes analisados, 16 adquiriram *S. aureus* na comunidade e 39 no ambiente hospitalar. Quarenta e seis (83,6%) necessitaram

internação hospitalar (p -valor = $0,0000018 < 0,05$) e 9 (16,4%) receberam tratamento ambulatorial. Dos 39 pacientes que adquiriram *S. aureus* no ambiente hospitalar, 9 (23,1%) foram a óbito (p -valor = $0,05$) e desses, 5 estavam infectados por *S. aureus* MRSA. Motivados pelos resultados do primeiro estudo, um segundo projeto, visando ampliar o universo de estudo das infecções causadas por *S. aureus*, principalmente das formas graves, o espectro de resistência apresentado a diversos antibióticos empregados na clínica e para avaliar a dinâmica do perfil de resistência no intervalo entre os dois estudos. Para tanto, a proposta foi caracterizar todos os isolados quanto à Taxonomia Clássica e Molecular, Sensibilidade e Resistência aos antibióticos e em caso de resistência, confirmar com ferramentas moleculares a presença dos genes que lhes conferissem tal fenótipo.

1.1. MICRO-ORGANISMOS E ANTIMICROBIANOS, UMA HISTÓRIA COM VÁRIOS CAPÍTULOS.

A história da microbiologia clínica se inicia em 1675 com Antony Van Leeuwenhoek na Holanda, ao descrever, com auxílio de seu microscópio, “pequenos animais” presentes em água de chuva estagnada. Estudos posteriores levaram à documentação formal dos micro-organismos. Em 1800, a população passa a utilizar os hospitais e estes se transformam em centros de treinamento médico.

Em 1841, Ignaz Semmelweis, trabalhando em um hospital de Viena, percebeu que na ala cuidada pelos médicos havia 18% mais mortes por sepse puerperal do que na ala cuidada pelas parteiras. A morte de um amigo, após o mesmo ter se ferido durante uma autópsia de uma paciente que havia ido a óbito por sepse puerperal levou Semmelweis a postular um possível ser invisível que causara as mortes de ambos e que poderia ser transferido do local da autópsia aos quartos da maternidade e, assim, infectar

as mães por ocasião do parto. Após instituir medidas sanitárias como lavagem das mãos dos médicos com desinfetante, limpeza dos aparelhos da sala de autópsia e limpeza dos aparelhos utilizados no procedimento de partos, a taxa de mortalidade diminuiu em torno de dois terços (ROSSI E ANDREAZZI, 2005).

Em 1877, Robert Koch cora esfregaços de bactérias com azul de metileno e em 1880, aproximadamente 200 anos depois das descrições de Leeuwenhoek, Ogston descreveu a doença estafilocócica e seu papel na sepse e na formação de abscessos.

Em 1905, Hans Christian J. Gram desenvolveu o método de Gram para identificação das bactérias gram-positivas e gram-negativas, e em 1929, Alexander Fleming publicou no *British Journal of Experimental Pathology*, o seu primeiro trabalho descrevendo a penicilina e seus efeitos sobre os micro-organismos gram-positivos. Fleming observou que *Staphylococcus* semeados “pareciam se dissolver”, sob a ação do *Penicillium*, mas, na época, a comunidade científica não deu muito crédito a essa descoberta. Somente em 1940, por ocasião da segunda guerra mundial na tentativa de salvar os soldados feridos em combate, a penicilina é produzida em maior escala e seu poder e disponibilidade dão origem à era dos antibióticos.

Ainda na década de 1940, Ernest Chain e E.P. Abraham descobrem uma substância originária da *E.coli* que podia inativar a penicilina. Esse foi o primeiro produto bacteriano reconhecido como resistente a um agente antibacteriano. Dois anos depois, em 1942 a resistência à penicilina começa a ser descrita em algumas dessas cepas, decorrente da produção de penicilinases. Este avanço na clínica médica rendeu a Howard Florey, Ernest Chain e Alexander Fleming o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1945.

De 1944 a 1945 cepas com produção de beta-lactamases (penicilinas) passaram a ser isolada em diferentes regiões levando a uma resistência substancial que limitou o uso da penicilina e seus derivados.

Em 1950, o Japão sofre a primeira grande epidemia de disenteria, e o agente etiológico era resistente aos antibióticos, fato que posteriormente foi elucidado como consequência de uma transferência genética entre espécies microbianas.

Em 1952, James T. Park e Jack L. Strominger descrevem o modo de ação da penicilina, ou seja, age inibindo a síntese da parede celular da bactéria. Cabe registrar que a penicilina mudou a maneira de como a medicina estava sendo praticada. A terapia e a profilaxia com antibióticos transformaram-se em regra na prática médica e em todos os tipos de tratamento: com indicação correta ou não.

Em 1959, O. Sawada demonstra que a resistência aos antibióticos pode ser transferida entre cepas de *Shigella* e *Escherichia coli* por plasmídios.

Em 1966, William Kirby e Alfred Bauer estabelecem padrões para o teste de sensibilidade aos antibióticos com base no princípio de disco difusão, procedimento que distingue cepas sensíveis de cepas resistentes. “Esse método permitiu aos laboratórios clínicos proverem informações com acurácia, reprodutibilidade e confiabilidade com relação à escolha dos antimicrobianos”.

Nos anos de 1960 e 1970, o uso indiscriminado de penicilinas semisintéticas, e cefalosporinas favoreceram a emergência de cepas de *S. aureus* MRSA resistentes a penicilinases (BROCK, 1975).

Em 1996 ocorre o primeiro alarme mundial com o trabalho de Hiramatsu, no Japão, sobre *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina ou GISA (*S. aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos), até então universalmente sensíveis a esta droga (HIRAMATSU et al., 1997).

Em 1997, cepas GISA foram relatadas nos EUA após detecção de quatro casos de infecção: Michigan (CDC, 1997), New Jersey (CDC, 1997), New York (ROTUN et al., 1999) e Illinois (CDC, 2002). A resistência foi atribuída a um espessamento da parede bacteriana. Esses pacientes apresentavam infecções crônicas e desenvolveram infecções por cepas GISA em diferentes sítios anatômicos, sem resposta clínica a vancomicina. Nos casos relatados não foi descrita colonização ou propagação dessas cepas aos membros da família ou aos funcionários do hospital.

Em 2000 foram descritas cepas GISA em São Paulo – Brasil, (OLIVEIRA et al., 2000), despertando uma preocupação epidemiológica para a detecção e o controle dessa resistência nos hospitais brasileiros. Quatro cepas foram isoladas de pacientes da unidade de queimados e uma cepa da unidade de ortopedia. Todos os pacientes estavam em uso de vancomicina há mais de 30 dias. O desenvolvimento da sensibilidade intermediária a vancomicina pode estar relacionado com o contato prolongado do micro-organismo com esse antimicrobiano (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Em 2002 foi relatada nos Estados Unidos a primeira cepa de *S. aureus* totalmente resistente à vancomicina (VRSA), em um paciente diabético de 40 anos e com o quadro de insuficiência renal crônica (NCCLS, 2003). Esse caso em especial merece destaque porque sugere um possível mecanismo de aquisição da resistência. O histórico médico do paciente registra antibioticoterapia (incluindo vancomicina) para o tratamento de uma úlcera crônica no pé, desde abril de 2001. Em abril 2002, o paciente foi submetido à amputação do dedo do pé, devido a um processo de gangrena, e, subsequentemente, desenvolveu bacteremia por MRSA devido a um enxerto infectado. O quadro não evoluiu bem, infecção do cateter venoso central, e ao exame de cultura e antibiograma houve o crescimento de um *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA). O dado surpreendente é que o exame de cultura e antibiograma da lesão do pé identificou

a bactéria *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina e que possuía em seu genoma o gene vanA. Esse gene nunca havia sido identificado em isolados clínicos de *S. aureus*, logo se sugeriu que a resistência possa ter sido adquirida pela transferência horizontal de material genético entre *Enterococcus* resistente a vancomicina e o *S. aureus*, (CDC, 2002).

O segundo caso de VRSA foi descrito em 2002, também nos Estados Unidos (CDC, 2002). Nesse isolado também foi identificada a presença do gene vanA e a hipótese levantada também foi de transferência horizontal de genes entre Enterococo Resistente a Vancomicina (VRE) e *S. aureus*. Esses achados são factíveis uma vez que a transferência horizontal do gene vanA de *Enterococcus faecalis* para *S. aureus* já havia sido demonstrada em condições laboratoriais (dez anos antes) (NOBLE et al., 1994).

No Brasil os primeiros relatos de cepas VRSA começaram a surgir entre 2000 e 2002 em Porto Alegre-RS, São Paulo - SP e Rio de Janeiro - RJ (TAVARES, 2004).

É importante reforçar a ineficiência crescente dos diferentes antibióticos diante de novos tipos de resistência e a necessidade de otimização na utilização desse arsenal terapêutico orientada por dados locais, além de uma ação integrada de equipes de saúde, (DIXON, 1994).

1.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

São cocos gram e catalase positivos que podem se apresentar aos pares, isolados ou como um cacho de uvas (do grego estaphyle = cachos de uva) à microscopia de luz devido a sua divisão celular que ocorre em três planos perpendiculares. São micro-organismos arredondados não móveis, que formam células esféricas medindo de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro (Fig. 1). Em sua maioria são aeróbicos podendo ser anaeróbicos facultativos. Desenvolvem-se melhor em meio contendo cloreto de sódio a 10 % e em

temperaturas que variam de 18° a 40° C (ótima de 37° C) e pH próximo a 7. Distinguem-se de outras espécies de estafilococos pelo pigmento dourado de suas colônias, e por apresentarem resultado positivo para o teste coagulase na fermentação do manitol e desoxiribonuclease (WILKINSON et al., 1997).

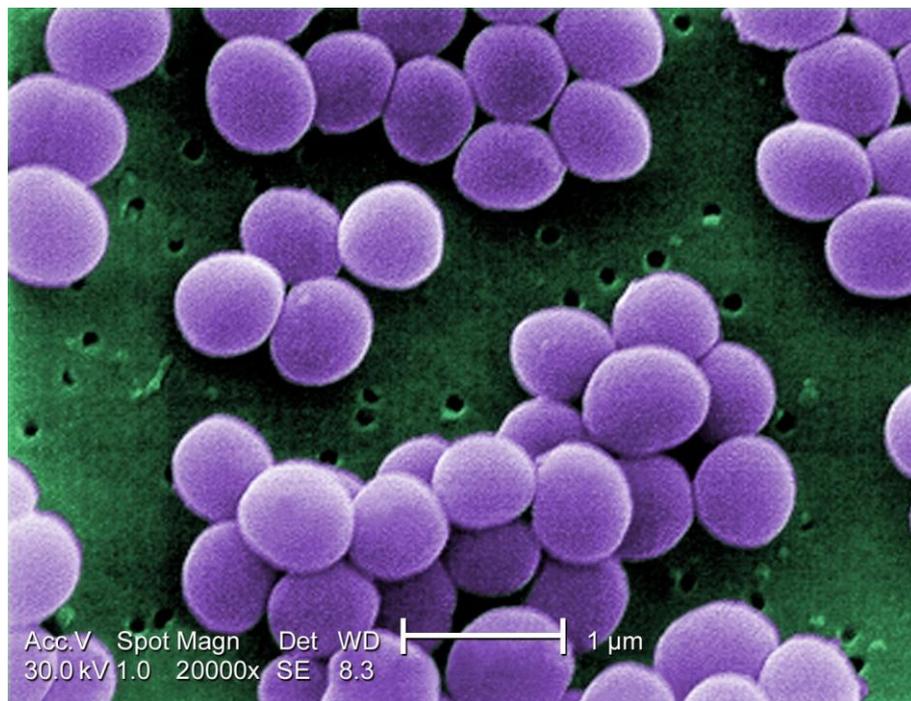


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus*. Aumento de 20 mil vezes e colorido por ferramenta de imagem. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention's Public Health image Library, número de acesso #11157.

A filogenia dessa bactéria vem mudando ao longo dos anos, muito em consequência dos dados moleculares, e apesar das divergências entre alguns pesquisadores em nível de classe (Coccus ou Bacilli), a tendência tem sido classificar *S. aureus* como uma eubactéria do filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família Staphylococcaceae, gênero *Staphylococcus* (Wattam, 2014). O gênero *Staphylococcus* possui 54 espécies descritas no banco Taxonomy do NCBI, desses, 17 podem ser isolados de amostras biológicas humanas.

Espécies do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota indígena da pele e membranas mucosas humanas, em especial a mucosa nasal. Em geral desenvolvem uma relação comensal com o hospedeiro humano, bem como em outros animais. Dentre as espécies do gênero *S. aureus*, se destaca. Considerado um patógeno oportunista, freqüentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar (FREIRAS, 2004). Certamente é a espécie de maior importância médica devido à gravidade das infecções que pode causar (KLUYTMANS, et al., 1995).

1.2.1. PAREDE CELULAR

Metade do peso da parede celular é constituída por peptídeoglicano, uma característica comum às bactérias-gram positivas (Fig. 2). É formada por cadeias de glicano constituídas por 10 a 12 unidades alternadas de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina; essas cadeias são ligadas por pontes peptídicas, onde as cadeias de glicano são ligadas por pontes de pentaglicinas que são ligadas a L-lisina em uma cadeia tetrapeptídica e a uma D-alanina em uma cadeia adjacente. O peptídeoglicano tem atividade semelhante á endotoxina, estimulando a produção de pirógenos endógenos, ativando o complemento e a produção de interleucina pelos monócitos e a agregação de leucócitos polimorfonucleares (processo responsável pela formação de abscessos), (LOWY, 1998).

O peptídeoglicano também estimula a liberação de citocinas pelos macrófagos, ativando o complemento e a agregação de plaquetas. Diferenças na estrutura do peptídeoglicano do *S. aureus* podem contribuir para sua capacidade em desencadear coagulação intravascular disseminada (KESSLER et al., 1991).

O ácido ribitol teicóico junto com o peptídeoglicano são os maiores componentes da parede celular. Os ácidos teicóicos são polímeros espécie-específica,

contendo fosfato ligado, covalentemente, à camada de peptidoglicano ou através de ligação lipofílica à membrana citoplasmática (ácidos lipoteicóicos); eles medeiam à fixação dos *estafilococos* às superfícies mucosas através de sua ligação específica a fibronectina.

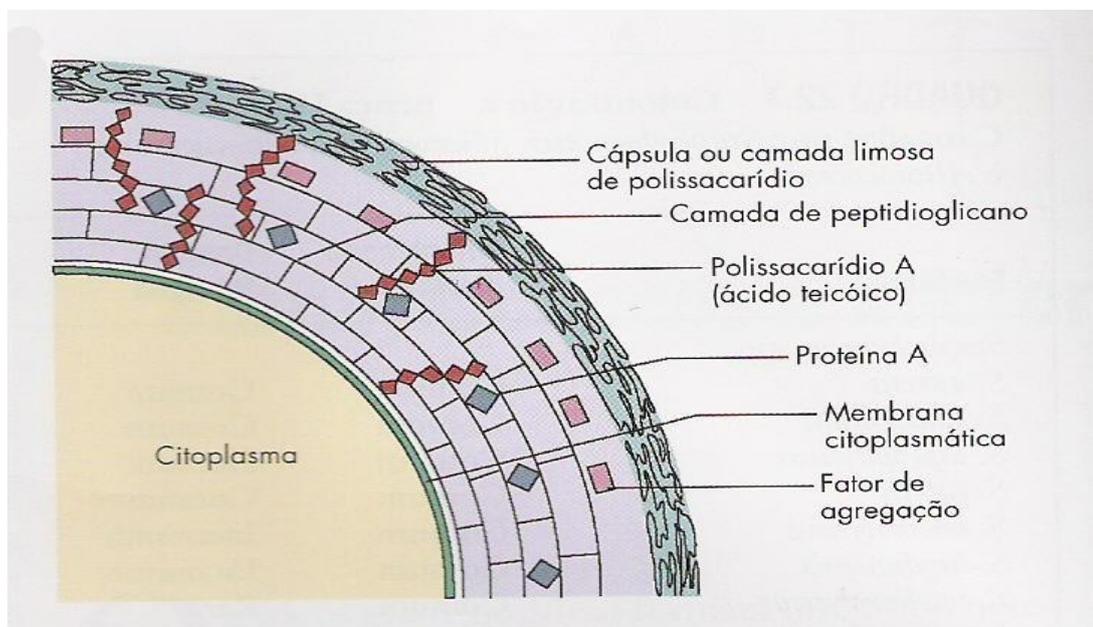


Figura 2: Estrutura da parede celular do *S. aureus*. Fonte: Microbiologia Médica (MURRAY et al., 2002).

A cápsula, ou camada limosa (Fig. 2), é uma frouxa camada de polissacarídeos, externa ao peptídeoglicano. É observada apenas ocasionalmente nos estafilococos cultivados *in vivo*. Existem 11 sorotipos capsulares. Os sorotipos 5 e 8 ocorrem em 75% das infecções em humanos. Muitos *S. aureus* meticilina-resistentes isolados são do tipo 5 (LEE, 1996).

1.2.2. Proteínas de Superfície

Muitas proteínas de superfície do *S. aureus* têm características estruturais em comum. A maioria das cepas é revestida uniformemente pela proteína A, que tem

propriedades antifagocitárias baseada em sua habilidade em se ligar à fração Fc (Fator complemento) das imunoglobulinas.

Existe também a coagulase, uma proteína que se liga ao fibrinogênio e o converte em fibrina insolúvel provocando a aglutinação ou agregação dos *estafilococos*. A ligação dessa proteína é o principal teste de identificação do *S. aureus* (FOSTER e MC. DEVITT, 1994).

Outras proteínas de superfície importantes para a aderência aos tecidos do hospedeiro são: a proteína de ligação ao colágeno, à proteína de ligação à elastina e a proteína de ligação à fibronectina. Essas proteínas têm um importante papel na habilidade do *S. aureus* em colonizar os tecidos do hospedeiro, (PATTI et al., 1994).

1.3. A doença estafilocócica

As complicações decorrentes da infecção por *Staphylococcus aureus* são conhecidas genericamente como doença estafilocócica. Descrito pela primeira vez em 1880 em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, *S. aureus* é um dos micro-organismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo mundo (SANTOS e SANTOS, 2007).

Algumas formas de doença hoje sabidamente provocadas por esses germes são relatadas em textos tão antigos quanto os da Bíblia. A sexta das dez pragas infligidas aos Egípcios foi descrita como uma doença que provoca tumores e chagas (feridas purulentas) nos homens e animais, e o pus é um dos sinais de infecção por *S. aureus* (ÊXODO 9.8-12).

Von Eif et al. (2001) descrevem dois tipos de portadores: aqueles em que *S. aureus* faz parte da microbiota permanente, aqueles em que *S. aureus* faz parte da

microbiota transitória. Esse mesmo grupo também relata que algumas pessoas não possuem *S. aureus* em sua microbiota indígena (Von Eif et al., 2001).

Aproximadamente 20% da população podem ser considerados portadores persistentes, sendo a maioria crianças. Por outro lado, uma grande parte da população (60%) alberga o *S. aureus* de forma intermitente (KLUYTMANS et al., 1995).

Inúmeros trabalhos referem maior índice de mortalidade entre os pacientes com *S. aureus* MRSA que em pacientes com *S. aureus* MSSA, assim como, pacientes com patologias de pele que alterem a sua função de barreira como dermatite, psoríase e doenças eczematísticas apresentam uma maior taxa de colonização e infecção por CA-MRSA, também pacientes com doenças que deprimam o Sistema Imunológico (como Neoplasias, Diabetes, Doenças Renais Crônicas, AIDS) ou que façam uso de medicamentos que deprimam o Sistema Imunológico como quimioterápicos, corticoides, etc...) tem maior chance de desenvolverem infecções graves por *S. aureus* MRSA (CHUNG et al., 2008).

No Brasil, Moreira e colaboradores descreveram após um estudo em um hospital universitário um maior número de sepse e mortalidade em pacientes com bacteremia por *S. aureus* MRSA (MOREIRA et al., 2008).

Staphylococcus aureus é capaz de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano e está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, constituindo-se em uma das principais causas de infecções adquiridas tanto na comunidade como no ambiente hospitalar (CORREAL et al., 2013). As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos, mas algumas podem se disseminar para diferentes tecidos e levar à formação de focos metastáticos. Formas mais graves podem acontecer como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais (LOVY, 1998). A doença

estafilocócica é mais frequente nos homens que nas mulheres na proporção de 2:1 talvez pela predileção dos homens por eventos traumáticos (SOLOAGA et al., 2004).

Sendo uma bactéria da microbiota humana como, por exemplo, garganta, intestinos, pele e narinas, *S. aureus* pode, a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e mucosas, caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas estejam comprometidas por trauma ou cirurgia (VELAZQUEZ-MEZA, 2005). Por essa característica, *S. aureus* é classificado como patógeno oportunista.

O número de infecções estafilocócicas adquiridas na comunidade e no meio hospitalar tem crescido muito nos últimos 20 anos. Esta tendência se deve ao aumento no uso de dispositivos intravasculares Banerjee et al. (1991), disseminação da AIDS, maior número de Neoplasias, maior número de cirurgias invasivas e do uso indiscriminado, errôneo ou incompleto de antibióticos, aumentando a proporção de infecções causadas por *S. aureus* metilicina resistentes (PANLILIO et al., 1992 e NABER, 2009).

1.3.1. DOENÇAS CAUSADAS POR *S. AUREUS*.

Staphylococcus aureus é o maior causador de doenças de pele, respiratórias, de ossos, articulações e doenças endovasculares. A maioria das infecções ocorre em pessoas com múltiplos fatores de risco para a infecção (MUSCHER et al., 1994; CORREAL et al., 2013).

Apesar da grande variedade de quadros clínicos causados pelo *S. aureus*, estes podem ser divididos em três principais tipos, (1) as infecções superficiais, tais como: abscessos cutâneos e as infecções de feridas; (2) as infecções sistêmicas, tais como: osteomielite, miosite tropical, endocardite, pneumonia e septicemia; e (3) os quadros

tóxicos, tais como: síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e a intoxicação alimentar e mais recentemente a fístula carótido-cavernosa após bacteremia por *S. aureus* (DAMASCO et al., 2012).

1.3.1.1. INFECÇÕES CUTÂNEAS E DO TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO

1.3.1.1.1. IMPETIGO

O impetigo é uma infecção da epiderme, normalmente de face e membros (Fig. 3). É mais frequente em crianças e jovens. Geralmente são lesões múltiplas devido à propagação para áreas adjacentes à pele e se apresentam em diferentes estágios de desenvolvimento. Começa com uma pequena área de eritema que progride até a formação de bolhas cheias de um líquido turvo, que com a ruptura leva à formação de crostas. *S. aureus* tem sido considerado o principal agente, desde 1980 (TRABULSI e ALTHERTHUM, 2004).

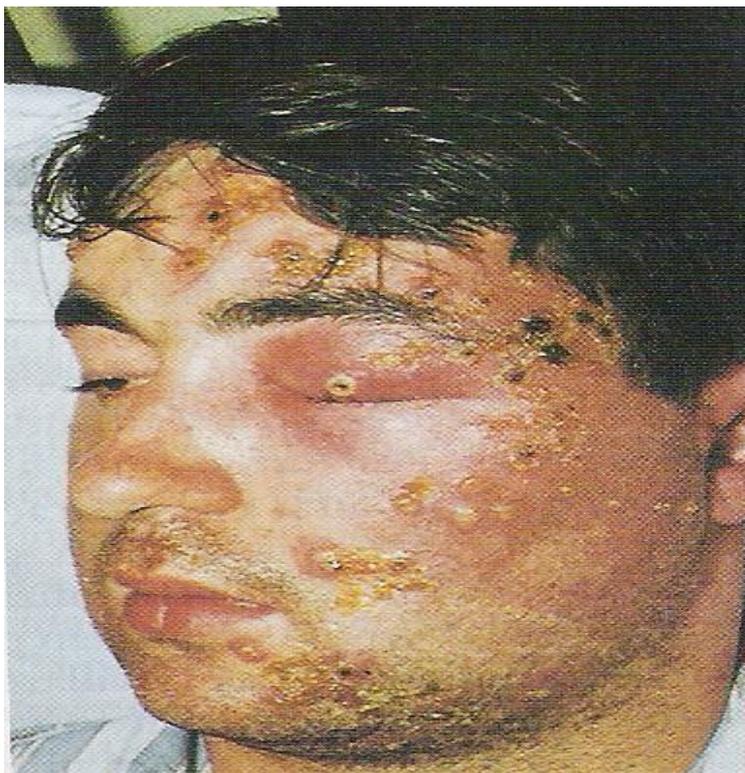


Figura 3: Impetigo Pustular. Fonte: Atlas de doenças infecciosas
(TRABULSI e ALTHERTUM, 2004).

1.3.1.1.2. Foliculite

A foliculite é uma infecção do folículo piloso com formação de uma pequena coleção de pus abaixo da epiderme. Quando ocorre nos pêlos das pálpebras, a infecção chama-se hordéolo ou terçol (Fig. 4).



Figura 4: Hordéolo. Fonte: O autor (2005).

1.3.1.1.3. Furúnculo ou Abscesso

O abscesso é uma extensão da foliculite que se apresenta sob a forma de nódulos dolorosos, com uma coleção de pus na parte central (Fig. 5).



Figura 5: Abscesso Inguinal. Abscesso inguinal sendo puncionado para retirada da coleção purulenta. Fonte: O Autor, 2005.

1.3.1.1.4. CARBÚNCULO

O carbúnculo ocorre quando os furúnculos coalescem e a infecção se estende para os tecidos mais profundos levando a celulites. Esses pacientes podem apresentar bacteremia com calafrios.

1.3.1.1.5. INFECÇÃO HOSPITALAR

Staphylococcus aureus também é a principal bactéria causadora de infecções de feridas cirúrgicas (BAORTO, 2002) (Fig. 6). E nesses casos, aumentam o tempo internação e consequentemente, o tempo e o custo do tratamento.

1.3.1.2. INFECÇÕES SISTÊMICAS

1.3.1.2. 1. BACTEREMIAS

A taxa global de mortalidade pela bacteremia estafilocócica tem mudado nos últimos anos. Fatores associados com o aumento da mortalidade incluem idade maior que 50 anos, não remoção do foco de infecção e concomitância com doenças cardíacas, neurológicas ou respiratórias.



Figura 6: Ferida cirúrgica infectada (Colostomia) por *S. aureus*. Fonte: O autor (2005).

Fowler et al. (2005), relataram que de 25% de pacientes com bacteremia, 23% possuíam cateteres como foco primário. Um dado preocupante levando-se em consideração o uso frequente desse dispositivo no ambiente hospitalar, e ainda, porque as bacteremias que persistem por mais de 72 horas após a remoção dos cateteres têm mais risco de complicações como: endocardites, abscesso metastático em vários órgãos e osteomielites, podendo também evoluir para sepse com mortalidade elevada (RAAD e SABBAGH, 1992).

1.3.1.2. 2. ENDOCARDITES

Staphylococcus aureus é responsável por 25 a 35% das endocardites (SANDRE e SHAFRAN, 1996). Ocorre principalmente em usuários de drogas endovenosas, pacientes idosos, pacientes com próteses valvulares e pacientes hospitalizados. Em todos esses grupos, os sintomas podem se limitar à febre e mal estar, o que dificulta o diagnóstico, ou podem ser mais exuberantes com início rápido, febre alta e frequente envolvimento das válvulas cardíacas (CHAMBERS et al., 1983).

A taxa de mortalidade por endocardite nosocomial é de 40 a 56%, e essa taxa se torna bem maior quando o agente é o *S. aureus* (FERNÁNDEZ-GUERREIRO et al., 1995).

1.3.1.2. 3. PNEUMONIA E EMPIEMA.

A pneumonia (Fig. 7) pode ser devida à aspiração de secreção oral ou disseminação hematogênica a partir de um foco infeccioso distante. A pneumonia por aspiração é primariamente observada em crianças de tenra idade, em indivíduos idosos, em pacientes com fibrose cística, influenza e bronquiectasias. O exame do tecido pulmonar revela inflamação e abscessos.

A pneumonia decorrente da disseminação hematogênica é comum em pacientes com bacteremias e endocardites. A pneumonia estafilocócica pode ser acompanhada de empiema, caracterizado por coleção de material purulento na pleura (Fig. 7) (KOLLY, 2005).

1.3.1.2. 3. OSTEOMIELITES

Staphylococcus aureus é o agente etiológico mais freqüente de osteomielite aguda e crônica. A bactéria pode alcançar os ossos por via hematogênica, em consequência de traumas cirúrgicos e por contiguidade. Na disseminação hematogênica, o tipo de osso afetado depende da idade do paciente. Na criança, a bactéria se localiza quase que exclusivamente nas extremidades dos ossos longos, enquanto no adulto, a maioria das infecções se localiza nas vértebras lombares e torácicas. Com alguma freqüência, os pacientes com osteomielite hematogênica apresentam antecedentes de infecções cutâneas ou traumas (MUSCHER et al., 1994).

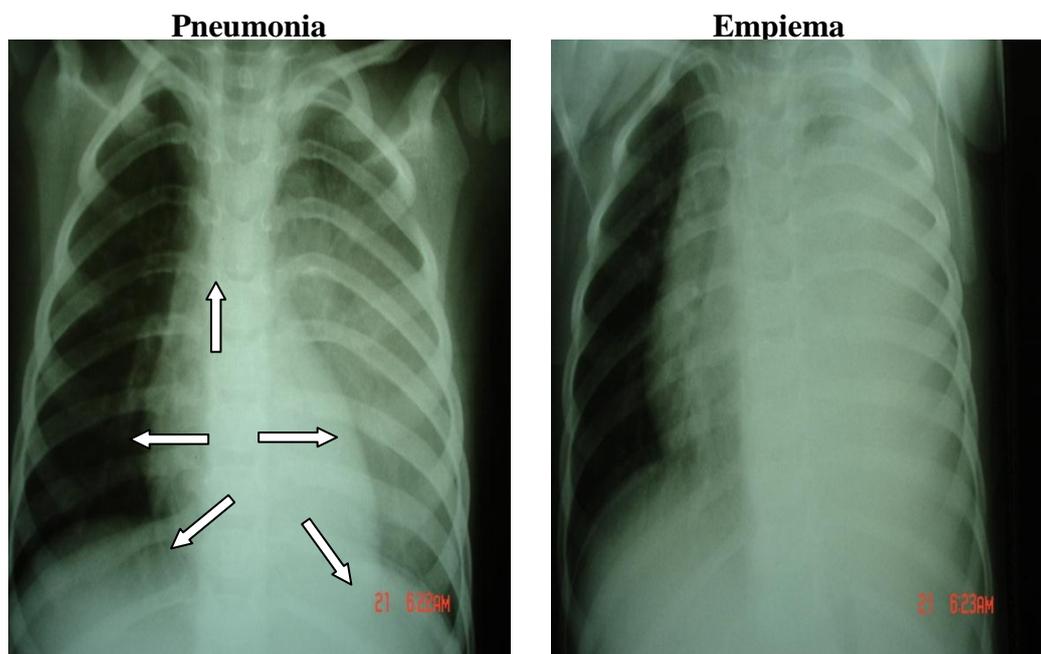


Figura 7: Quadro de Pneumonia Estafilocócica e Empiema: A parte preservada do pulmão apresenta imagem escurecida, característica nas condições normais; A imagem esbranquiçada revela acúmulo de líquido purulento; as setas indicam a silhueta cardíaca. Quadro de Empiema: Fonte: O Autor (2005).

1.3.1.2. 3. CHOQUE SÉPTICO

A minoria das infecções locais ou bacteremias progride para o choque séptico (Fig. 8) e *S. aureus* é reconhecido como um dos seus agentes etiológicos mais comuns (BONE, 1994; CASEY et al., 1993). Os fatores de risco para a sepse incluem idade avançada, imunossupressão, quimioterapia e procedimentos invasivos. As manifestações clínicas da sepse incluem febre, hipotensão, taquicardia e taquipnéia (Figura 7) (BONE, 1994). Vários casos progridem para disfunção de múltiplos órgãos, disseminação intravascular disseminada, acidose láctica e morte, (BONE, 1994).

1.3.1.3. QUADROS TÓXICOS

1.3.1.3.1. SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO

A síndrome do choque tóxico ganhou notoriedade entre 1980-1981, quando numerosos casos foram associados com a introdução de tampões superabsorventes usados durante a menstruação. Essa doença é caracterizada pelo final fulminante, geralmente em pacientes previamente saudáveis (Fig. 9). O diagnóstico é clínico e se caracteriza por febre alta, rash eritematoso com conseqüente descamação, hipotensão e falência múltipla de órgãos (CHESNEY et al., 1981).

Em 90% dos casos a síndrome do choque tóxico se relaciona à menstruação. As causas não menstruais como: infecções localizadas, cirurgias e picadas de insetos são responsáveis por cerca de um terço dos casos (MARRACK e KAPPLER, 1990).

Pacientes com síndrome tóxica não menstrual apresentam uma taxa de mortalidade maior que os pacientes com síndrome tóxica menstrual (WERGELAND et al., 1991).



Figura 8: Recém-nascido em choque séptico. Sepses por *S. aureus*, lesões necróticas disseminadas e *rush* cutâneo. Fonte: O Autor (2005).

1.3.1.3.2. INTOXICAÇÃO ALIMENTAR

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das intoxicações alimentares mais frequentes e graves, é decorrente da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado por *S. aureus*, mesmo que este já não esteja mais viável no alimento contaminado (BALABAN e RASOOLY, 2000).

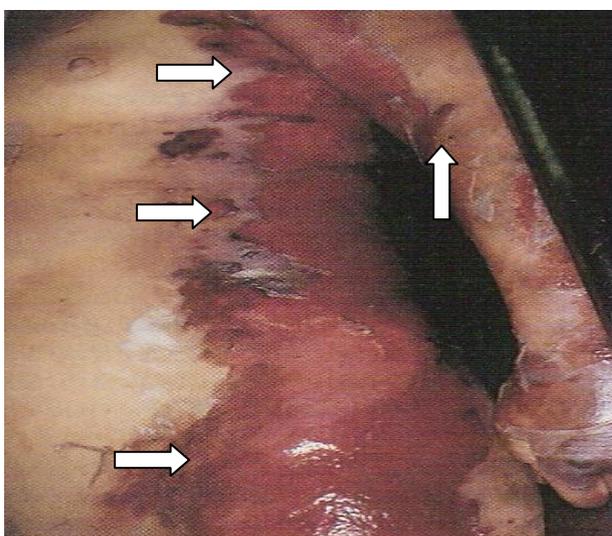


Figura 9: Síndrome do Choque Tóxico. Paciente apresentado *rush* cutâneo, descamação e necrose celular pelo *S. aureus*, são lesões semelhantes a queimaduras. Fonte: (Murray et al., 2002).

Os sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica consistem em náuseas, vômitos, mal estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Podem resultar em desidratação, sudorese e cefaléia geralmente acompanhados de febre, geralmente quatro horas após a ingestão de alimentos e duram em média 12 horas (MURRAY, 2002).

A pele e a mucosa do homem atuam como reservatórios de *estafilococos*, resultando em importante fonte de contaminação de alimentos e, nos animais domésticos o *S. aureus* é considerado o principal agente das infecções em glândula mamária (OLIVEIRA et al., 2002).

A gastroenterite estafilocócica pode ser causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas. Estima-se que de 100 ng a 1 µg de toxinas são suficientes para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (BERGDOLL, 1990). Em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAS) investigados pelos laboratórios de saúde pública do Estado de São Paulo, entre 1994 e 1998, Freiras e colaboradores (2004) publicaram que das amostras analisadas em 776 surtos, o agente causal foi identificado em 400 deles, e desses, *S. aureus* foi o mais prevalente (43,7%), demonstrando sua importância para a saúde pública.

As enterotoxinas estafilocócicas podem ser detectadas *in vitro* ou pelas suas atividades biológicas *in vivo*. A detecção de rotina é realizada por métodos imunológicos como imunodifusão, radioimunoensaio (RIA), aglutinação em látex, imunoblotting e ensaios enzimáticos (ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e a detecção específica de genes de toxinas, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BAYLES e IANDOLO, 1989).

1.3.1.3.3. SÍNDROME DA PELE ESCALDADA.

Também conhecida como doença de Ritter ou doença de Lyell (Ladhani et al., 2000 e Ladhani, 2001), foi descrita pela primeira vez por Von Rittershain em 1878 que observou essa doença em crianças muito pequenas em um asilo na Czechoslovakia (Fig. 10) (VON RITTERSHAIN, 1878).

A Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome - SSSS) caracteriza-se por uma ou várias coleção bolhosas na epiderme de neonatos e crianças, embora adultos com infecções latentes também possam vir a desenvolver a doença (LADHANI et al, 2001). Recebe esse nome porque o descolamento da epiderme se assemelha a queimaduras de segundo grau em extensas áreas do corpo do paciente. O descolamento da epiderme ocorre porque a esfoliatina (produzida por *S. aureus*) destrói as desmogleinas, glicoproteínas componentes dos desmosomos e contribuem para a junção célula-célula (LADHANI et al., 2003).

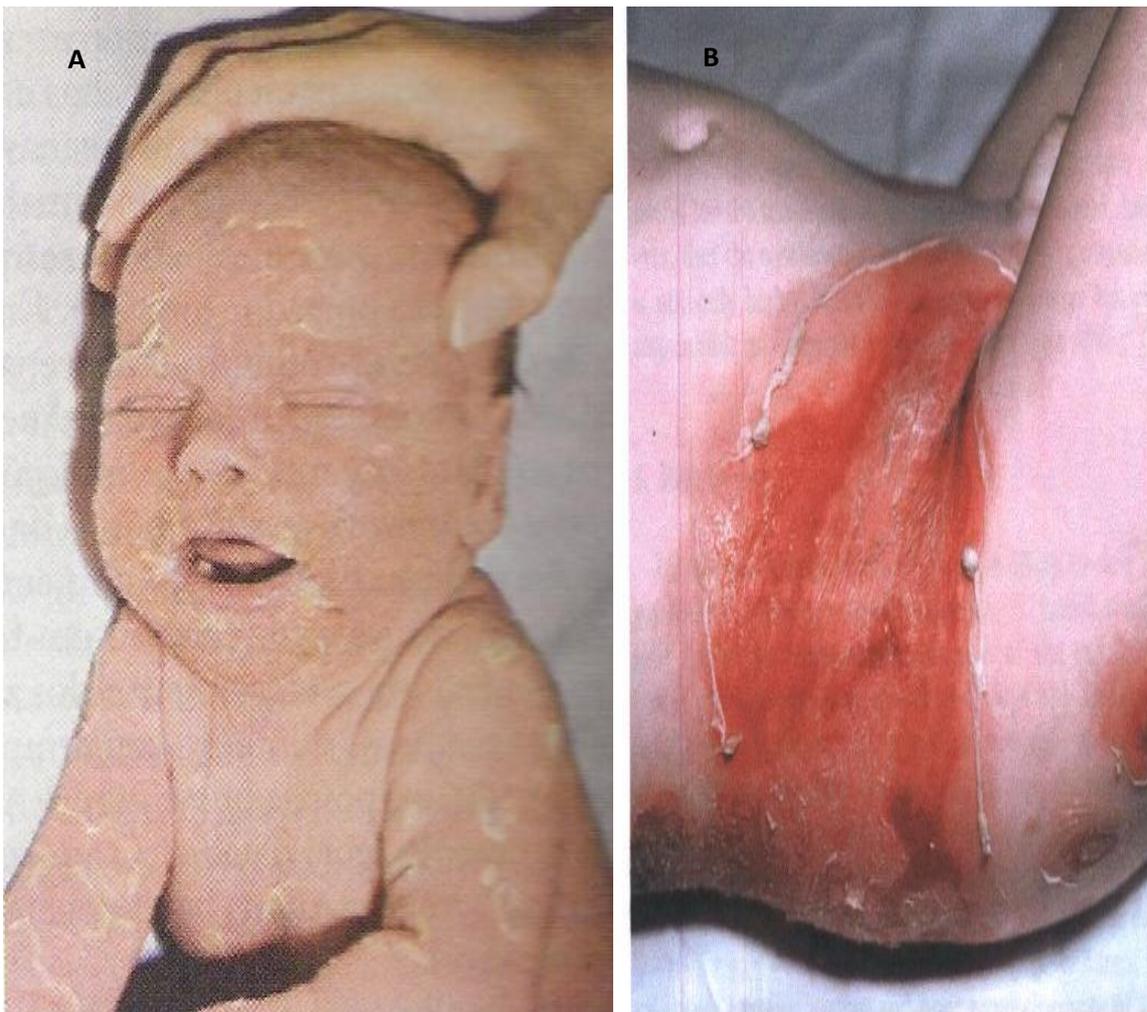


Figura 10: Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica. Em A, lesões descamativas disseminada em recém-nascido ainda no ambiente hospitalar. Em B, infecção comunitária em lactente, sendo evidenciada lesão ulcerativa comprometendo toda região lombar e flanco direito. A, fonte: O Autor (2005). B, fonte B: Trabulsi e Alterthum (1987).

Cabe observar que o deslocamento da epiderme observado no impetigo bolhoso estafilocócico também provocado pela secreção de esfoliatina, mas nesse caso, as lesões cutâneas são altamente contagiosas (CRIBIER et al., 1992), o que difere da síndrome da pele escaldada, porque nesse caso, feridas e secreções não são contagiosas.

É raramente fatal em crianças, com uma mortalidade inferior a 5% (Cribier et al., 1984; Gemell, 1995), mas quando acomete adulto a mortalidade é superior a 50% (CRIBIER et al., 1984).

1.4. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA ESTAFILOCOCICA

As infecções sanguíneas causadas por *S. aureus* são sem dúvida as infecções mais frequentes e de difícil tratamento, assim como de alta morbi mortalidade, enfrentadas pela medicina nos últimos tempos (WISPLINGHOFF et al., 2004 e NABER, 2009).

As bacteremias desencadeadas por *S. aureus*, particularmente pelas cepas MRSA, tem aumentado muito nos últimos 30 anos, principalmente pelo acréscimo do número de cirurgias invasivas, pelo aumento do uso de dispositivos intravasculares (cateters, shunts, próteses e etc.), pelo aumento no número de pacientes imunocomprometidos por infecções por HIV, uso de quimioterápicos por transplantes ou tratamento de neoplasias. Esse cenário tem grande impacto nas finanças do sistema de saúde, pela alta incidência de complicações como endocardite e infecções metastáticas, o que demanda maior tempo de tratamento, maior tempo de internação hospitalar e a necessidade de antibióticos mais potentes e conseqüentemente mais caros (TROIDLE et al., 2007 e FOWLER et al., 2005).

Nos Estados Unidos, *S. aureus* é o principal patógeno isolado em pacientes no ambiente hospitalar e o segundo mais frequente patógeno isolado no ambiente comunitário (só precedido pela *E. coli*), (STYERS et al., 2006). No Brasil, os primeiros casos de infecções estafilocócicas causadas por CA-MRSA foram documentados no hospital das clínicas da Universidade de São Paulo (TRINDADE et al., 2005). Em 2013, Correal e colaboradores reportaram em hospitais do Rio de Janeiro e Porto Alegre o surgimento de cepas SCC mec IV, geneticamente relacionadas ao clone USA 800 (CORREAL et al., 2013).

De acordo com o SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), após examinar mais de 81.000 isolados no período de 1997-2002, *S. aureus* foi a causa mais comum de bacteremia hospitalar na América do Norte (prevalência de 26%) e América Latina (prevalência de 21,6%) e a segunda mais comum causa de bacteremia na Europa (prevalência de 19,5%) (BIEDENBACH et al., 2004 e OLIVEIRA et al., 2014).

Devido à aquisição de resistência aos antimicrobianos, MRSA tem se perpetuado nos ambientes de assistência à saúde, aumentando os custos e complicações, sobretudo em pacientes imunossuprimidos e/ou internados em UTIs (HIDRON et al., 2008). *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina é atualmente o patógeno mais comumente identificado como agente de infecções nos hospitais em muitas partes do mundo, incluindo Europa, Américas, Norte da África, Oriente Médio e Leste da Ásia (BIEDENBACH et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014).

Dados do National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) mostram que os MRSA foram responsáveis por 59,5% das infecções causadas por *S. aureus* em UTIs de vários hospitais nos EUA (2006-2007) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Ainda neste país em 2011, o número de pacientes com infecção por MRSA foi de 80.461, sendo que 11.285 casos resultaram em morte. Dados do programa SENTRY de Vigilância à Resistência Antimicrobiana englobando Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Venezuela e Uruguai mostram que o MRSA é a causa mais comum de bacteremia em pacientes hospitalizados, com prevalência de 21,6% (FOWLER et al., 2005; COREY, 2009 ; HIRAMATSU, 1997 ; OLIVEIRA et al., 2014).

Delgado et al., 2011, publicaram um estudo sobre 1306 culturas positivas para *S. aureus* realizado no Hospital Universitário Pedro Ernesto aonde se observou 21,1% de cepas com perfil CA-MRSA , 16,5 % de cepas com perfil HA- MRSA e 62,3% de cepas

com perfil MSSA e a mortalidade geral nesse grupo de pacientes foi de 30,5% sendo que a mortalidade foi maior nos pacientes com perfil HA-MRSA (43,5%) e perfil CA-MRSA (35,5%) comparados com o perfil MSSA (25,4%).

1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Para iniciar um processo infeccioso, *S. aureus* se adere aos tecidos ou a dispositivos proteicos (próteses), e para tal, lança mão de uma variedade de proteínas de superfície reconhecidas como moléculas adesivas da matriz (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules – MSCRAMMS) (PATTI et al., 1994 e CORREAL et al., 2013). Após a adesão, *S. aureus* ativa mecanismos de escape ao sistema imune do hospedeiro, favorecendo assim o desenvolvimento da infecção. Um desses mecanismos é a formação de biofilmes (coleções extracelulares de polímeros produzidos pela bactéria e que garantem as condições de proteção contra as defesas imunológicas e a ação dos antimicrobianos).

1.5.1 TOXINAS

O *S. aureus* possui numerosas toxinas que são agrupadas conforme seu mecanismo de ação (Tabela 1). As citotoxinas levam a formação de poros e induzem alterações pré-inflamatórias nas células dos mamíferos. O dano celular pode contribuir para a manifestação da síndrome séptica, (BHAKDI et al., 1991).

Os superantígenos das toxinas piogênicas são estruturalmente relacionados, compartilhando vários graus de uma homologia de aminoácidos. A função desses antígenos é se ligar ao complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II causando uma extensa proliferação de células T e lançando citocinas (MARRACK e KAPPLER, 1990).

Tabela 1: Principais grupos de toxinas expressas por *S. aureus*

Grupos por mecanismo de ação	Toxinas	Referências
Superantigenos das Toxinas Piogênicas	SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ	Carmo et al., 2002
	SEK e SEL	Orwin et al., 2001 e 2003
	SEM, SEM, SEO	Loir et al., 2003
	SEU	Letertre et al., 2003
	Síndrome do Choque Tóxico TSST-1	Bergdoll et al. 1981
	Esfoliativa	Tipos A e B
Tipo C		Sato et al., 1994
Tipo D		Yamaguchi et al., 2002
Citolíticas ou produtoras de lesão de membrana	Leucocidinas alfa, beta, delta e gama, Panton-Valentine (P-V)	FREIRAS et al., 2004

Fonte : Harrison et al., 2015

Em diferentes domínios as moléculas das enterotoxinas são responsáveis por duas patologias graves que são a síndrome do choque tóxico e a intoxicação alimentar (HARRIS et al., 1993).

As toxinas esfoliativas A, B, C e D, causam eritema e descamação da pele e são responsáveis pela síndrome da pele escaldada estafilocócica que é observada com mais frequência em crianças de pouca idade (Fig. 10). O mecanismo de ação dessas toxinas

se baseia na destruição da desmogleína e epidemiologicamente associam-se a infecções cutâneas graves (CRIBIER et al., 1992).

As enterotoxinas estafilocócicas (SES) podem ser detectadas de rotina por métodos imunológicos como imunodifusão, radioimunoensaio (RIA), aglutinação em látex, imunobloting e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Um método alternativo para verificar a capacidade enterotoxigênica de linhagens de estafilococos é a detecção específica de genes de toxinas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), (FREIRAS et al., 2004).

1.5.2. ENZIMAS, ELEMENTOS GENÉTICOS E OUTROS COMPONENTES BACTERIANOS.

Staphylococcus aureus produz várias enzimas, como: nucleases, proteases, lipases, colagenases e hialuronidases, além de outras enzimas como catalase, fibrinolisinase, coagulase e beta-lactamase (Fig. 11), que tem a capacidade de levar a destruição tecidual e expansão da infecção (LOWY, 1998).

Mais de 90% dos *S. aureus* eram sensíveis à penicilina até 1941, ano em que este antibiótico foi utilizado pela primeira vez. Clinicamente, entretanto, a resistência à penicilina se desenvolveu rapidamente, principalmente devido à produção da penicilinase (β -lactamase) pelos micro-organismos. A distribuição disseminada do gene dessa enzima foi garantida pela sua presença em plasmídeos transmissíveis. Atualmente só 5% dos *S. aureus* são sensíveis à penicilina (LOWY, 1998). A β -lactamase é uma enzima capaz de inativar a penicilina e se localiza na membrana citoplasmática, envolvida pela parede celular (WILKINSON et al., 1997).

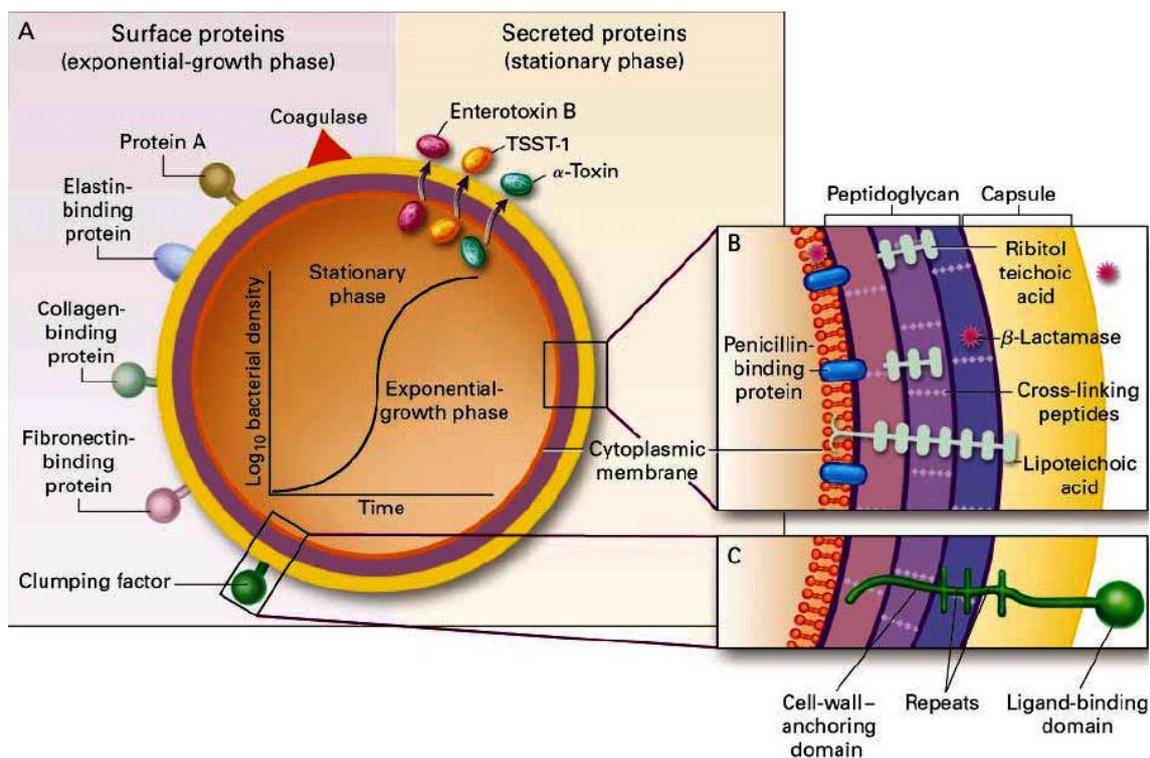


Figura 11: Fatores de virulência do *S. aureus*. Em A, a esquerda, são evidenciadas proteínas de superfície e à direita, proteínas secretadas. A síntese de muitas destas proteínas está condicionada à fase de crescimento, representado na figura pela curva de crescimento. Em B e C, a membrana e parede celular foram ampliadas para mostrar proteínas de superfície, como a enzima β -lactamase que confere resistência à penicilina (em B), bem como proteínas com organização estrutural semelhante à do fator de aglutinação (em C). TSST-1 indica a síndrome do choque tóxico da toxina 1. (Adaptado de Lowy, 1998)

As cepas de *S. aureus* possuem duas formas de coagulase: ligada ou livre. A coagulase ligada à parede celular do estafilococo é um ativador da protrombina, podendo converter diretamente o fibrinogênio em fibrina insolúvel, com consequente aglutinação dos estafilococos. A coagulase livre produz o mesmo resultado ao reagir com o fator plasmático globulínico, formando estafilotrombina, semelhante à trombina. Esse fator catalisa a conversão do fibrinogênio em fibrina insolúvel, induz a formação

de uma camada de fibrina ao redor do abscesso estafilocócico, localizando assim a infecção e protegendo os micro-organismos da fagocitose (WILKINSON et al., 1997).

Esse arsenal bioquímico caracteriza um fenômeno conhecido como plasticidade genética, já muito bem estudado em outros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (Ziebandt et al., 2010 e Shen et al., 2006). A plasticidade genética confere imensa vantagem adaptativa porque pode conferir resistência a drogas, maior capacidade de penetração nos tecidos e escape às defesas do hospedeiro.

O genoma do estafilococo consiste de um cromossomo circular com aproximadamente 2,8 milhões de pares de base, organizados em um cromossomo circular único. Entretanto, além dos genes vitais, conhecido como *core genome*, o patógeno apresenta outros elementos genéticos como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e profagos (Fig. 12), que passam a serem determinantes nas infecções estafilocócicas no homem e nos animais (LOWY, 1998 e NOVICK, 1990).

A resistência do *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações ou pela aquisição de genes de resistência de outras ou até de outros gêneros e espécies, por exemplo, *Enterococcus* sp. Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto que a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou destruição da droga sendo transmitida por plasmídeos, fagos ou transposons (LIMA et al., 2005).

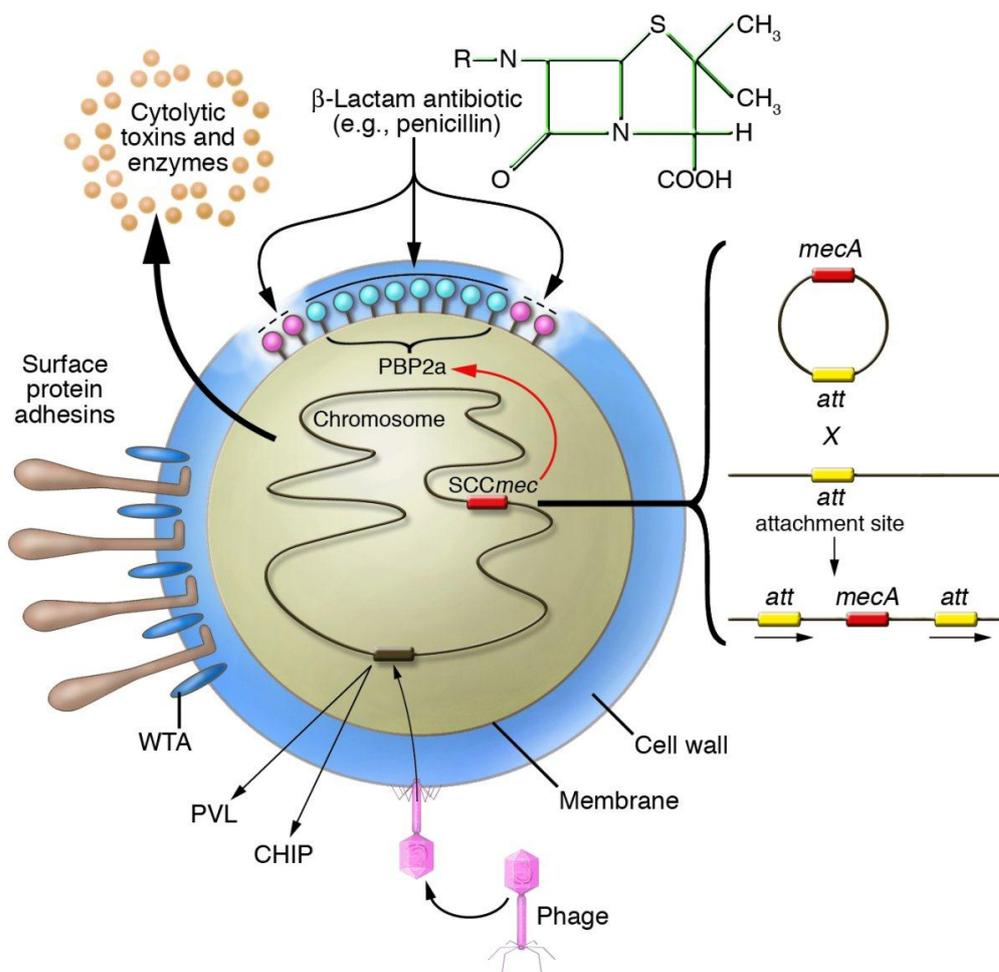


Figura 12: Diagrama esquemático ilustrando como *S. aureus* adquire resistência à meticilina e sua capacidade de expressar diferentes fatores de virulência. A bactéria expressa adesinas e toxinas de superfície e também secreta muitas toxinas e enzimas por expressão de genes cromossômicos. A resistência à meticilina é adquirida via transferência horizontal do *cassete* *SCCmec* e este pode se inserir no cromossomo por recombinação. O gene *mecA* codifica uma proteína β-lactâmica refratária à ligação da penicilina, PBP2a, e portanto a síntese de novos peptidoglicanos da parede celular não fica comprometida. Alguns fatores de virulência como PVL e as proteínas inibidoras de quimiotaxia, Chip, são codificadas por genes localizados em profagos. (Adaptado de Foster, 2005).

A resistência à metilina é determinada por um gene cromossômico (*mecA*) que codifica para um receptor beta-lactâmico (PBP2a) com baixa afinidade pelo antibiótico o que resulta na resistência (Fig. 12). Um estudo feito em 1996, com cepas de diferentes continentes, mostrou a presença de cinco cassetes estáveis nos cromossomos estafilocócico relacionados com a resistência à metilina, SCC MEC I, II, III, IV e V (Velazquez-Meza, 2005). Existem ainda cepas resistentes resultantes de mecanismos independentes do *mecA*, como a de β -lactamase, PBPS alteradas (1, 2 e 4) e hiperprodução de PBP4 (YOSHIDA et al., 2005; HOWDEN et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2014)

Cepas resistentes à metilina eram, ou acreditava-se ser restrito ao ambiente hospitalar (HA-MRSA), entretanto em meados da década de 2000, foram reportadas cepas comunitárias com resistência a esse antibiótico, CA-MRSA, essas cepas resistentes à metilina/oxacilina foram encontradas na comunidade, os indivíduos que as portavam não foram internados em hospitais no ano anterior à infecção, nem foram submetidos a procedimentos médicos invasivos, como diálise, cirurgias ou uso de cateteres (BRATU et al., 2006 e OLIVEIRA et al., 2014).

As principais diferenças entre as cepas CA-MRSA e HA-MRSA são as manifestações clínicas, associadas geralmente a (1) infecções de pele e partes moles; (2) casos recorrentes de infecções respiratórias e hematogênicas e (3) perfil de resistência aos antibióticos, pois HA-MRSA se caracterizam por uma ampla resistência aos diversos antibióticos e as cepas CA-MRSA mostram uma sensibilidade em torno de (85% a 100%) a drogas como clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprim e vancomicina, mostrando-se resistentes apenas a oxacilina e a outros betalactâmicos (LOPES, 2005 e CORREAL et al., 2013).

Além disso, os cassetes cromossômicos que determinam o perfil de resistência à meticilina, até o momento, apresentam um perfil conservado de herança: os tipos I, II, e III são encontrados nas cepas HA-MRSA, já os tipos IV e V são observados em cepas CA-MRSA. Outra característica do CA-MRSA é a presença dos genes *lukF-PV* e *lukS-PV*, que codificam a leucocidina Pantón–Valentine (PVL), que é capaz de causar lesão tecidual em infecções de pele primárias severas e pneumonias necrotizantes (LARCOMBE et al., 2007).

Cepas MRSA tem se perpetuado nos ambientes de assistência à saúde, muito provavelmente devido à seleção exercida pelos antimicrobianos, o que em última análise, vem aumentando os custos e complicações do tratamento, sobretudo em pacientes imunosuprimidos e /ou internados em UTIs (HIDRON et al., 2008). Cepas MRSA são os agentes etiológicos mais comuns nas infecções hospitalares de várias partes do mundo, incluindo Europa, Américas, Norte da África, Oriente Médio e Leste da Ásia (BIEBENDACH et al., 2004 e OLIVEIRA et al., 2014).

Dados do National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) mostram que cepas MRSA foram responsáveis por 59,5% das infecções causadas por *S. aureus* em UTIs de vários hospitais nos EUA no biênio 2006/2007 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Ainda neste país, em 2011, o número de pacientes com infecção por MRSA foi de 80.461, sendo que 11.285 casos resultaram em morte. Dados do programa SENTRY de Vigilância a Resistência Antimicrobiana englobando Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Venezuela e Uruguai mostram que o MRSA é a causa mais comum de bacteremia em pacientes hospitalizados, com prevalência de 21,6% (FOWLER et al., 2005; COREY, 2009 ; OLIVEIRA et al., 2014).

1.6. PATOGÊNESE DA DOENÇA ESTAFILOCÓCICA

Staphylococcus aureus tem um arsenal diverso de componentes e produtos que contribuem para a patogênese da infecção. Esses componentes e produtos têm uma sobreposição de papéis e podem atuar juntos ou sozinhos.

A virulência de *S. aureus* é notável, porque é um comensal que pode colonizar a narina, axila, vagina, região inguinal e superfícies de pele erodada ou com solução de continuidade (NOBLE et al., 1994; CASEWELL, 1986; OLIVEIRA et al., 2014)).

A infecção se inicia quando existe uma quebra da barreira de pele ou mucosa permitindo ao patógeno, o acesso para dentro dos tecidos e/ou para a circulação sanguínea. Se a infecção será contida ou não, vai depender dos fatores de virulência *S. aureus* e dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

O primeiro passo na patogênese é a colonização; os seres humanos colonizados assintomáticos são o principal reservatório para a disseminação inter-humana, cerca de 20% da população é considerada como portador persistente, sendo a maioria crianças e 60% alberga o *S. aureus* de forma intermitente (KLUYTMANS et al., 1997 e OLIVEIRA et al., 2014).

Para iniciar um processo infeccioso, *S. aureus* se adere aos tecidos ou a dispositivos proteicos e para tal lança mão de uma variedade de proteínas de superfície reconhecidas como moléculas adesivas da matriz (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules – MSCRAMMS) (PATTI et al., 1994; CORREAL et al., 2013) (Fig. 13).

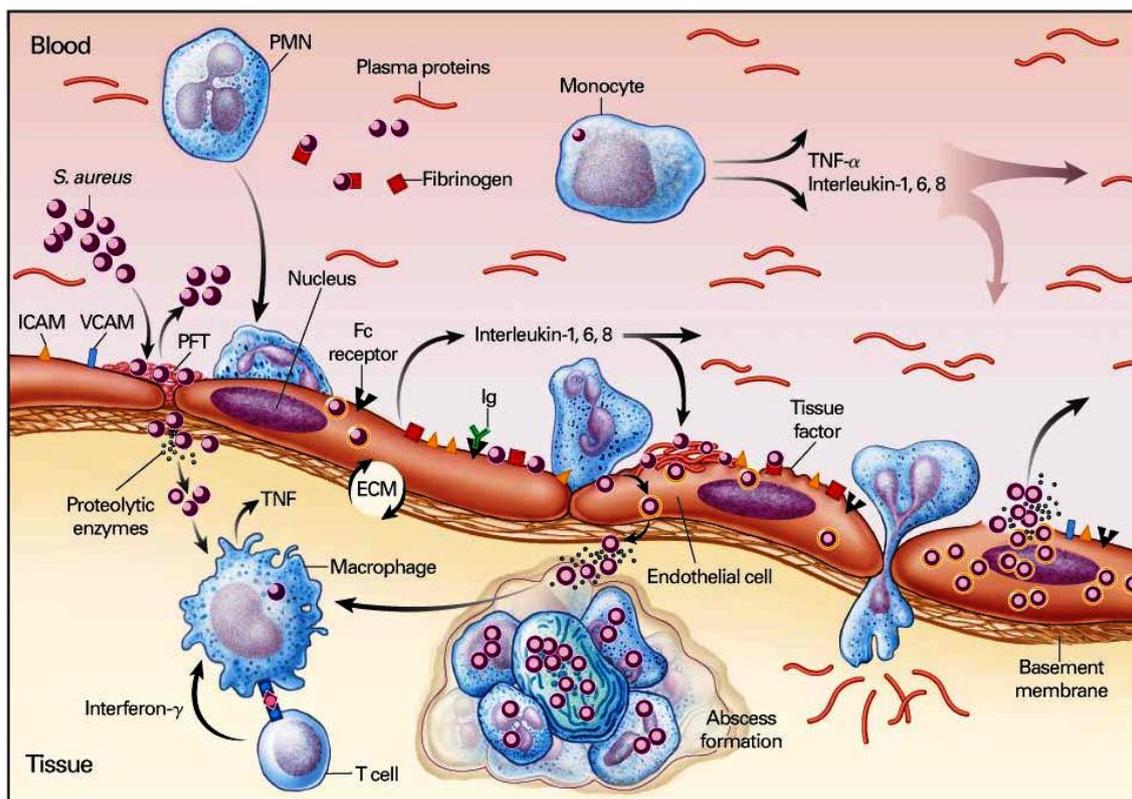


Figura 13: Evolução da infecção por *S. aureus*: A sequência de eventos progride da esquerda para a direita. Estafilococos circulantes se ligam a lesões endovasculares, regiões onde se formam os trombos de plaquetas e fibrina (PFT). A adesão pode ser mediada por MSCRAMM, através de interações diretas via receptor de adesinas ou por meio de fibrinogênio. A adesão promove modificações do endotélio e alterações do microambiente, tais como alterações na matriz extracelular (ECM) o que pode sinalizar alterações na susceptibilidade celular à infecção. Após a fagocitose por células endoteliais, as bactérias secretam enzimas proteolíticas o que facilitam a disseminação para os tecidos adjacentes e a liberação de estafilococos na corrente sanguínea. Nos tecidos adjacentes subepiteliais, as bactérias provocam resposta inflamatória que resulta na formação de abscessos. Depois da fagocitose, as células endoteliais expressam receptores Fc e moléculas de adesão (moléculas de adesão celular vascular, VCAM e moléculas de adesão intercelular ICAM) e secretam as interleucinas 1, 6 e 8, que recrutam os leucócitos para o local da infecção. As citocinas liberadas na corrente sanguínea por monócitos, macrófagos e células endoteliais, contribuem para as manifestações da seps e vasculite associada com a doença estafilocócica sistêmica. A expressão de receptores Fc pode contribuir para a vasculite ocasionalmente encontrada durante a bacteremia, servindo de local para ligação de imunoglobulina (Ig) ou de complexos imunes. PMN indica de leucócitos polimorfonucleares (Lowvy, 1998).

Uma vez aderido, usa seus recursos para escapar ao sistema imune do hospedeiro e obter tempo suficiente para desenvolver a infecção. Um desses mecanismos é a formação de biofilmes (coleções extracelulares de polímeros produzidos pela bactéria e que garantem as condições de proteção contra as defesas imunológicas e a ação dos antimicrobianos. Quando as circunstâncias são favoráveis, ocorre a invasão tecidual, dependente de secreção de hidrolases e liases como proteinases, fosfolipase C, bem como proteínas de superfície para sobreviver ao sistema imune do hospedeiro. A cápsula antifagocítica é o mecanismo primário contra a atividade fagocítica de neutrófilos, monócitos e macrófagos (FOSTER e MC DEVITT, 1994). Além disso, as proteínas ligantes de fibronectina (um tipo de MSCRAMM) favorece sua evasão à fagocitose.

Para encontrar proteção essa bactéria cria pontes de fibronectina com a célula endotelial do hospedeiro, usando as integrinas β -1, e assim consegue, após adentrá-la, se proteger das células do sistema imune extracelular (FOWLER et al., 2005 e CORREAL et al., 2014).

Para evitar a imunidade mediada por anticorpos, *S. aureus* expressa uma proteína de superfície chamada proteína A (codificada pelo gene SPA). Uma vez ligada à região Fc das imunoglobulinas do hospedeiro, a proteína A inibe a opsonização e a fagocitose.

Cerca de 50% dos isolados de *S. aureus* secretam a proteína inibitória de quimiotaxia (CHIPS) que limita o recrutamento dos neutrófilos. Estas bactérias também produzem leucocidinas, fatores que podem atacar e destruir as membranas dos leucócitos mediante a formação de poros. Um tipo de leucocidina é a toxina Pantón – Valentine (PVL), cujos genes estão codificados em um bacteriófago integrado ao genoma bacteriano (LABANDEIRA-REY et al., 2007).

Além desses mecanismos numerosas cepas produzem toxinas com capacidade de criar distúrbios fisiológicos específicos. As toxinas classificadas como superantígenos produzem uma tormenta de citocinas, assim como aumento na proliferação clonal de células T, são exemplos a toxina da síndrome do choque tóxico estafilocócico (Toxic Shock Syndrome Toxin-1, TSST-1), e a toxina esfoliativa. (DAMASCO et al., 2012)

A capacidade de ser capaz de atravessar as barreiras naturais e de se evadir do sistema imune explicam como ocorrem as infecções graves. O risco de infecção aumenta com a presença de corpo estranho, inclusive o tipo do fio de sutura pode interferir na incidência de infecção, fato reportado em trabalhos ainda da década de 1950 (Eleck e Conen, 1957).

1.6.1. INFECÇÃO INVASIVA / SISTÊMICA.

A bacteremia estafilocócica pode se complicar com endocardite, infecção metastática ou síndrome séptica. A célula endotelial é o pivô principal desse processo patogênico, não somente sendo o objetivo central da injúria, mas também contribuindo com ativação de fatores para a progressão da doença endovascular.

Estudos demonstraram, *in vitro*, que após a aderência às células endoteliais o patógeno a adentra (HAMIL e VANN, 1986). O ambiente intracelular protege o estafilococo dos mecanismos de defesa do organismo tanto quanto dos efeitos bactericidas dos antibióticos.

Demonstou-se que o interior das células endoteliais nutre grandes colônias variantes. Esse fato permite o aumento da sobrevivência bacteriana e contribui para o desenvolvimento de infecções persistentes ou recorrentes (PROCTOR et al., 1995).

O evento que leva ao choque séptico, na infecção estafilocócica, tem como atores principais monócitos e macrófagos, além de leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais e plaquetas. Os monócitos lançam o fator de necrose tumoral α , a interleucina 1, interleucina 6 e interleucina 8 após contato com o estafilococo intacto (TIMMERMAN et al., 1993 e HEUMANN et al., 1994). Ao contrário, a ativação da interleucina 1 e interleucina 6, pelas células endoteliais, requerem a fagocitose bacteriana. Como resposta à citocina e ativação celular, o complemento e os diferentes caminhos da coagulação são ativados, o ácido aracdônico é metabolizado e o ativador plaquetário é lançado. Esses eventos por sua vez levam à febre, hipotensão, extravasamento vascular, coagulação intravascular disseminada, depressão do miocárdio e disfunção múltipla de órgãos. Vários componentes dos estafilococos podem ser capazes de iniciar uma síndrome séptica (BONE, 1994).

1.6.2 TOXINAS MEDIANDO DOENÇAS

Os superantígenos das toxinas piogênicas levam a doenças que ameaçam a vida e se caracterizam pelo início rápido de febre alta, choque, extravasamento vascular, e disfunção de múltiplos órgãos. Superantígenos são células T mitógenas, que junto com as citocinas e macrófagos, são responsáveis pela síndrome do choque tóxico que patofisiologicamente se assemelha ao choque endotóxico. Em ambas as síndromes, as bactérias induzem a produção e liberação de uma quantidade excessiva de citocinas que levam a destruição tissular (BOHACH et al., 1990; BONE, 1994).

1.7. RESPOSTA DO HOSPEDEIRO A INFECÇÃO

A típica alteração patológica encontrada na doença estafilocócica é a formação de abscesso, pois os leucócitos são os primeiros agentes de defesa na infecção causada

pelo *S. aureus* (VERDRENGH e TARKOVSKI, 1997). A migração de leucócitos para o local da infecção resulta da aderência de moléculas às células endoteliais. As citocinas mediadoras do processo, são ativadas por bactérias e macrófagos tissulares e, levam para dentro do sítio de ataque, às células inflamatórias que irão tentar conter a infecção formando o abscesso, isolando-o do organismo com a formação de uma capsula de fibrina (YAO et al., 1997 e NABER, 2009).

1.8. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença estafilocócica é feito pelo quadro clínico e por exames laboratoriais.

1.8.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico clínico se baseia nos sinais e sintomas da doença e vão variar de acordo com o tipo de doença estafilocócica, os órgãos atingidos, a resistência do hospedeiro e a virulência da bactéria, mas de uma maneira geral, *S. aureus* atinge o organismo de 2 formas: ou invadindo os tecidos e/ ou produzindo toxinas que podem ter efeitos em sítios distantes do foco de infecção (BAORTO EP e BAORTO D, 2004).

O sinal clássico da infecção estafilocócica é o abscesso, que consiste em uma parede de fibrina envolvendo um tecido inflamado com uma região central contendo pus, o próprio *S. aureus* e leucócitos. A partir desse foco de infecção o patógeno pode se disseminar hematogenicamente para qualquer lugar do organismo fazendo novos abscessos, esse processo é facilitado por sua habilidade em elaborar enzimas proteolíticas, isso tudo pode resultar em pneumonias (com tosse, febre, dispnéia, derrame pleural, e até mesmo necrose pulmonar), infecções ósseas e articulares (com febre, dor à deambulação e destruição óssea), infecção das válvulas cardíacas (com

insuficiência cardíaca) e sepse com falência de múltiplos órgãos e sistemas podendo levar ao óbito, (BAORTO EP e BAORTO D, 2004).

1.8.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.8.2.1. CULTURA E ANTIBIOGRAMA

A identificação do *S. aureus* pode ser feita através de cultura de amostras clínicas como: sangue, secreções e ponta de cateter (KLOSS e LAMBRE, 1991). Esse material é inoculado seletivamente no meio Ágar-sangue ou Agar manitol salgado (suplementado com 7,5% de cloreto de sódio e manitol), isto porque o cloreto de sódio inibe o crescimento de outros micro-organismos e o manitol é fermentado especificamente pelo *S. aureus*. Os estafilococos crescem em meio sólido como Agar-sangue e líquido como o tioglicato. A maioria das espécies apresenta crescimento de colônias de aspecto circular e liso medindo de 1 a 3 mm, após incubação a 37 ° C por 24 a 48 h em Agar-sangue (KLOSS e SCHEIFER, 1975).

No meio de Agar-sangue o estafilococo coagulase positivo (*S. aureus*), pode ser diferenciado macroscopicamente de coagulase negativo (*S. epidermidis*) pela formação de um anel de hemólise ao redor das colônias (Fig. 14). As colônias coagulase positivo têm, geralmente, um anel amarelo-dourado, como resultado da presença de carotenóides. Enquanto os coagulase-negativos têm ausência de hemólise ao redor das colônias em Agar-sangue, suas colônias são de cor cinza ou branca macroscopicamente (KLOSS e LAMBRE, 1991 e KLOOS e SCHEIFER, 1975).

O antibiograma pode ser utilizado como método de diferenciação entre as cepas, é simples, barato e muito utilizado nos laboratórios de microbiologia. Existem limitações como método isolado na diferenciação entre as cepas (PFALLER, 1991).

1.8.2.2 TESTES BIOQUÍMICOS

Os testes bioquímicos como: reação positiva da coagulase (fator de agregação), nuclease termoestável, fosfatase alcalina e manitol podem ser usados para diferenciar o *S. aureus* de outros estafilos (KLOOS e SCHEIFER, 1975; KLOSS e LAMBRE, 1991).



Figura 14: Teste da coagulase em ágar-sangue. Colônias de *S. aureus* crescendo em placa de petri preparada com ágar-sangue. Ao redor das colônias se forma uma alo dourado em decorrência da hemólise. (Adapatado de TRABULSI e ALTHERTUM, 2004).

1.8.2.3. MÉTODOS MOLECULARES

Os métodos de tipagem molecular de micro-organismos, tais como o estudo das proteínas (immunoblot, fingerprint, perfil de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida), do DNA plasmidial e DNA cromossômico, e mais recentemente MALDI-TOFI, têm sido preferido pelos clínicos e epidemiologistas (PFALLER, 1992, WOLTER et al., 2011), o que explica a adesão crescente dos métodos moleculares em detrimento dos métodos fenotípicos como forma de confirmar a proximidade entre cepas envolvidas em um surto..

A primeira técnica molecular baseada no DNA empregada para tipagem do *S. aureus* foi à análise do DNA plasmidial (MAC GOWAN et al., 1979 e LOKSLEY et

al., 1982). Os plasmídios são elementos genéticos extracromossômicos que podem transferir informação genética entre diferentes bactérias ou entre bactérias de uma mesma espécie, podendo as bactérias ganhar ou perder plasmídios.

As bactérias podem ter um ou mais plasmídios. *Staphylococcus aureus* carrega geralmente poucos plasmídios (MULLIGAN e ARBEIT, 1991). Entre outras características, os plasmídios carregam os genes determinantes da resistência bacteriana, como por exemplo, a produção de beta-lactamase responsável pela resistência dos estafilococos à penicilina natural (ARBER e MACKEL, 1988).

Muitos métodos moleculares estão disponíveis para a identificação das cepas MRSA como: PFGE (pulsed-field electrophoresis), PCR (DEPALNO et al., 2000), análise RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), Meca : Tn 554 probe Typing (DOMINGUEZ et al., 1994), staphylococcal cassette chromosome MEC elemento (SCC mec) typing (PEREZ-ROTH et al., 2004), multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) (SABAT et al., 2003 e FRANCOIS et al., 2007).

A análise do perfil plasmidial pode sugerir a disseminação de uma cepa epidêmica dentro de um determinado hospital (BRANCHINI et al., 1993) ou entre dois ou mais hospitais (SADER et al., 1993). Assim, a análise plasmidial tem sido utilizada para explicar a ocorrência de padrões de resistência não usual ou múltipla. O perfil plasmidial, padrão criado quando plasmídios são separados com base no peso molecular por eletroforese em gel de agarose, também pode ser utilizado para caracterizar a similaridade das cepas bacterianas (SCHLICHTING et al., 1993).

Há anos a PFGE tem sido considerado padrão-ouro, apesar de alguns trabalhos terem questionado esse status (NEMOY et al., 2005) por ser difícil de implementar em todos os laboratórios clínicos. Alternativas como métodos que usam a PCR, incluindo registros de spa e MLVA tem sido mais facilmente utilizados (MALACHOWA et al.,

2005). Nenhuma dessas abordagens, porém parecem ser suficiente para resolver questões subclonais de clones altamente prevalentes (SENGUPTA DJ et al., 2014)

A partir da década de 1990, presença do gene *mecA* passou a ser investigada em isolados de *S. aureus* resistente a penicilinas, cefalosporinas, meticilinas, carbapenens e outros antibióticos (BRANCHINI et al., 1993). E desde então, vários outros genes passaram a ser investigados pela técnica da PCR, um método rápido, prático e capaz de detectar a informação genética até mesmo em amostras complexas contendo material genético do hospedeiro e do patógeno.

1.8.2.4. EXAMES INESPECIFICOS

Os exames inespecíficos são inconclusivos para o diagnóstico, são indicativos de alterações comumente encontradas na infecção estafilocócica como: leucograma com leucocitose ou leucopenia, velocidade de hemossedimentação elevada, proteína C reativa aumentada, Raios-X para o diagnóstico de pneumonias e osteomielites, ultrasonografia, tomografia axial computadorizada e ressonância magnética, muito útil para localizar abscessos internos e outras alterações no interior do organismo, e cintilografias para a detecção de reações inflamatórias (LOWY, 1998).

1.9 TRATAMENTO

O tratamento quimioterápico a ser instituído na doença estafilocócica é dependente do antibiograma; já o tempo de tratamento, dependerá do tipo de doença, da virulência da cepa e da resistência do hospedeiro (ANTINORI et al., 1994).

No início dos anos de 1940, *S.aureus* isolados dos mais diferentes processos infecciosos eram sensíveis à penicilina (Fig. 15). Em 1942 a resistência à penicilina começou a ser descrita, de 1944 a 1945 cepas produtoras de beta-lactamases

(penicilinases que hidrolisam a anel beta-lactâmico das penicilinas) passaram a ser isoladas ao redor do mundo, o que limitou o uso da penicilina e seus derivados no decorrer dos anos seguintes (FLEMING, 1929 e FLEMING, 1998).

Na década de 1950 as cepas produtoras de penicilinases passaram a predominar entre os pacientes hospitalizados, com isso se buscou uma alternativa para esse problema foi quando em 1960 a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para as cepas produtoras de penicilinases (CHAIN et al.,1999). Em 1961, um ano depois do início de seu uso em larga escala ao redor do mundo, cepas resistentes à meticilina começam a ser descritas e foram denominados de MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) (Barber, 1961; Kallings 1962; Lane, 1962).

Existem vários mecanismos de resistência a meticilina. Um bastante comum se deve a uma alteração na proteína fixadora ou ligadora de penicilinas (PBPs) codificadas pelo gene *mecA*. A presença da PBP2a ou PBP2 faz com que a meticilina e os compostos penicilina-penicilinase resistente (PPR) tenham baixa afinidade pelo local de fixação da bactéria à parede celular, e, conseqüentemente deixem de ter ação. Na mesma linha de modificação de receptores de membrana, cepas denominadas MODSA (modified penicilin-binding protein *S. aureus*) também produzem proteínas de ligação à penicilina modificadas (PBPs 1, 2 e 4), diferentes de PBP2a e são gene *mecA* negativas (UTSUI e YAKOTA, 1985).

Além disso, a resistência pode ser devida a hiperprodução de beta-lactamase tipo A, que hidrólise parcialmente o anel beta-lactâmico das penicilinas, cepas com esse perfil de resistência são denominadas BORSA (borderline oxacillin-resistant *S. aureus*).

As infecções de pele e tecidos moles são as principais infecções causadas pelo *S. aureus*, e a terapêutica consiste em drenagem das coleções purulentas precocemente e antibioticoterapia (TANG e STRATTON, 2010; CORREAL, 2013).

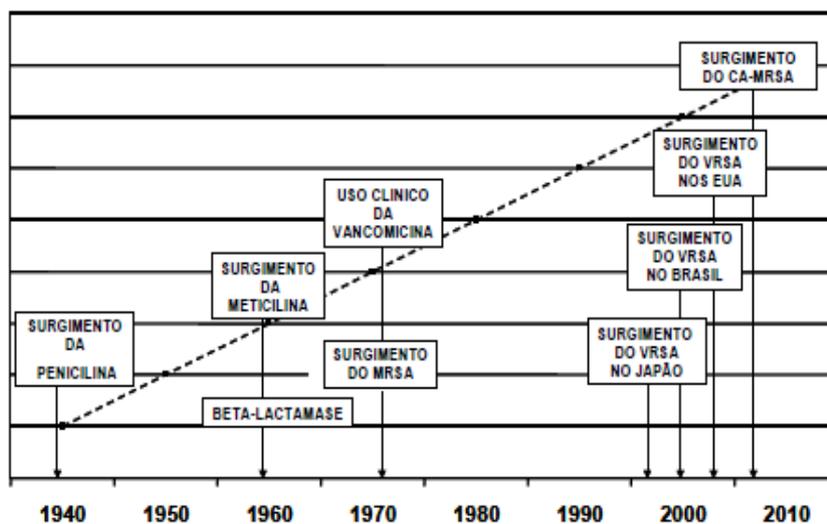


Figura 15: Cronograma de resistência do *S. aureus*. Aspectos clínicos, antibiótico terapia e perfil de resistência apresentados por *S. aureus* ao longo de 70 anos. Fonte: Santos et al., 2007.

Os quadros mais graves com presença de toxinas, exemplo Síndrome do Choque Tóxico além de antibióticos deve-se instituir terapêutica para os sintomas com terapia hídrica agressiva para o controle da hipotensão (CORREAL et al., 2013).

Os antibióticos mais comumente usados na doença estafilocócica são: penicilina G; oxacilina; vancomicina e teicoplanina (cepas MRSA). Outras classes mais recentes de antibióticos como estreptograminas (quinupristina / dalfopristina), oxazolidona (linezolida) e lipopeptídeos (daptomicina), dalbavancina, telavancina, ornitavancina e tigecilina podem ser opções de tratamento de cepas MRSA assim como cefalosporinas de quinta geração (ceftobripole e o ceftaroline) (ROSSI e ANDREAZZI, 2005; CORREAL et al., 2013). O uso criterioso dessas novas classes é imperativo para que possamos preservar essas opções terapêuticas.

Em 1996 cepas GISA ou VISA (germes resistentes a meticilina e com sensibilidade intermediária a Vancomicina), foram isoladas em pacientes que apresentaram falha terapêutica na vigência de vancomicina, além disso, todas elas foram previamente caracterizadas como MRSA (HIRAMATSU, 1997) (Fig. 15). E em 1997

quatro casos foram relatados em Michigan (CDC-United States: August 1997), Nova Jersey (CDC-United States: September, 1997), Nova York (Rotun et al., 1999) e Illinois (CDC-Illinois: January, 2000).

Em 2000 cinco cepas GISA foram descritas em São Paulo (Brasil), (OLIVEIRA et al., 2000), quatro na unidade de queimados e uma na unidade de ortopedia e todos os pacientes estavam em uso de vancomicina por mais de 30 dias. Os glicopeptídeos agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana (peptidoglicano) por interação com o precursor D-alanil-D-alanina (efeito sobre a integridade da parede celular) (Reynolds, 1989).

A cepa VISA de *S. aureus* apresenta um espessamento importante da parede celular dificultando a absorção dos glicopeptídeos fato esse documentado por microscopia eletrônica (CUI et al., 2003). As opções terapêuticas para essas cepas incluem rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprim, gentamicina e cloranfenicol ou combinações. Em ação conjunta com a equipe da GCIH (Grupo de Controle de Infecção Hospitalar), pode ser considerado o uso de quinupristina/dalfopristina (estreptograminas) e linezolida (oxazolidona) e associações de antibióticos como vancomicina e betalactâmicos (SANTOS AL e SANTOS D O, 2007 e CORREAL et al., 2013).

A duração do tratamento antibiótico deve ser feita por no mínimo 10 dias (CORREAL et al., 2013). Medidas terapêuticas complementares, como drenagem cirúrgica de abscessos, empiema, desbridamento de lesões necróticas e desvitalizadas, remoções de corpos estranhos e de seqüestros ósseos na osteomielite crônica, retirada de dispositivos intravasculares, cateteres, shunts e próteses infectadas, têm de ser consideradas para a erradicação da infecção estafilocócica (ANTINORI et al., 1994 e SOYER et al., 1994; NABER, 2009).

1.10. PREVENÇÃO

Vacinas e imunoglobulinas (Vacina conjugada de *S. aureus*) estão sendo testadas em vários grupos de risco, com resultados não muito satisfatórios, não definitivos, (SCHINEFIELD et al., 2002 CORREAL et al., 2014).

Medidas adequadas de higiene com os ferimentos, com os orifícios naturais, e lavagem adequada das mãos, principalmente em ambiente hospitalar, limpeza adequada da superfície de pele que será manipulada, assim como a cobertura das superfícies cutâneas expostas, por material estéril, evitariam, com certeza, a maioria das infecções em pacientes sadios (THOMPSON et al., 1984; BOYCE, 1992), pois *S. aureus* é um micro-organismo comensal da pele e mucosas, que se aproveita de falhas do hospedeiro para invadi-lo (FEKETY, 1964).

A implementação de um programa de vigilância epidemiológica ativo, começando com a necessidade de esclarecimento por parte dos profissionais de saúde, da instrução de seus pacientes para que cumpram a posologia dos antibióticos receitados, bem como investimentos em saúde pública, em campanhas visando à educação da população, implementação de pesquisas científicas no Brasil e no mundo, e programas de inovações tecnológicas para, a descoberta ou síntese de novos e mais eficazes antibióticos e vacinas para combater de forma mais eficientemente esses agentes infecciosos, principalmente os multirresistentes sem dúvida ajudariam em muito o controle dessas infecções.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- a) Descrever os caracteres epidemiológicos, clínicos, taxonômicos e moleculares das estafilococcias provocadas pelo *S. aureus* em Manaus – Amazonas, detectadas no laboratório de análises clínicas do Hospital Unversitário Getúlio Vargas no período de abril a outubro de 2005 e agosto de 2010 a agosto de 2012.

2.2. ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar epidemiologicamente os pacientes portadores de *S. aureus* no Hospital Unversitário Getúlio Vargas no período de abril de 2005 a outubro de 2005 e agosto de 2010 a agosto de 2012 em Manaus –AM. Identificar os *S. aureus* sensíveis a Meticilina (Oxacilina) (MSSA) e resistentes a Meticilina (Oxacilina) (MRSA), associados a comunidade (CA-MRSA) e associados ao ambiente hospitalar (HA – MRSA).
- b) Confirmação da taxonomia por análise das sequências do SSU rDNA
- c) Análise da presença de genes de resistência por PCR.

3. METODOLOGIA

O presente estudo foi autorizado pelo CEP/UFAM sob o número 0217.0.115.000-10. A participação dos pacientes se deu de forma voluntária mediante manifestação expressa no Termo de Consentimento Livre e Esclarecida.

3.1. MODELO DE ESTUDO

Trata-se de 2 estudos transversais: o primeiro envolvendo 55 pacientes com cultura positiva para *S.aureus* detectados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas de abril a outubro de 2005 e um segundo estudo analisando 58 pacientes detectados no mesmo laboratório 5 anos após, no período de agosto de 2010 a agosto de 2012. Em todos eles, um total de 114 pacientes fez-se um estudo prospectivo e observacional desde o diagnóstico de sua detecção no laboratório até a alta ou óbito onde foram realizados os diagnósticos epidemiológico, clínico e laboratorial.

3.2. UNIVERSO DE ESTUDO

3.2.1. PARTICIPANTES

Participaram desse estudo todos os pacientes com culturas positivas (hemocultura, cultura de secreções e abscessos, escaras e feridas assim como ponta de cateter) para *S. aureus*, identificados no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Getulio Vargas em Manaus-AM no periodo de 14 de abril de 2005 a 14 de outubro de 2005 e agosto de 2010 a agosto de 2012, em meio Agar-sangue.

3.2.2 AMOSTRAS

Foi composta por 55 culturas positivas para o *S. aureus* semeadas no período de 14 de abril de 2005 a 14 de outubro de 2005 e 58 culturas também positivas para o *S. aureus* no período de agosto de 2010 a agosto de 2012, no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas em Manaus-AM.

3.2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para inclusão neste estudo, consideramos pacientes de qualquer faixa etária, sexo, raça, portadores de *estafilococcias* e com cultura positiva para *S. aureus*, que aceitaram participar do estudo com autorização assinada em termo de consentimento próprio.

Os critérios de exclusão foram: (1) portadores de estafilococcias que não tiveram a cultura positiva para *S. aureus* e (2) os pacientes com cultura positiva para *S. aureus* que se recusarem a participar do grupo de estudo.

3.3 COLETA E PURIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ESTUDADAS

O estudo se iniciou após identificação dos indivíduos portadores de infecção por *S. aureus* (confirmada por hemocultura, cultura de secreções produzidas por *S. aureus* e cultura de ponta de cateter), que deram entrada no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas no período de abril de 2005 a outubro de 2005 (grupo A) e de agosto de 2010 a agosto de 2012 (grupo B).

Esse material foi coletado dos pacientes por solicitação médica e depois de cuidados de assepsia e antissepsia local, foram transportados em frascos estéreis: ponta de cateter em frasco estéril e seco, as secreções através de swab em Meio de Stuart e as hemoculturas em frascos com meio líquido automatizado na proporção de 1 ml de sangue para cada 10 ml de líquido próprio automatizado (Bactec), até o setor de microbiologia onde foram processadas.

No laboratório as secreções e pontas de cateter foram semeadas em meios de cultura específicos (Agar Sangue para a detecção de germes Gram positivos e Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) para Gram negativos), em seguida foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 1^{\circ} \text{C}$ e após um período de 18 a 24 horas foi feita à visualização macroscópica das colônias. Posteriormente se fez o antibiograma em sistema automatizado (micro Scan auto Scan 4).

As hemoculturas, depois de coletadas em frasco próprio, foram incubadas em estufa (Bactec 9050) por $35 \pm 1^{\circ} \text{C}$ e após positividade, que variou de 12 horas a 24 horas, se fez à semeadura em Agar sangue e Eosina Azul de Metileno. As hemoculturas negativas para a leitura de 24 horas permaneceram incubadas por até cinco dias, para avaliar uma eventual positividade.

As secreções foram semeadas em Ágar Sangue e Eosina Azul de Metileno (BEM), as pontas de cateter foram semeadas pelo teste de Maki, através de rolamento em Agar Sangue e após 24 h de incubação foram realizadas as visualizações macro e microscópicas. O antibiograma também foi feito pelo método automatizado no Micro Scan Auto Scan Quatro. Todos os *S. aureus* isolados resistentes a meticilina (MRSA) e sensíveis a meticilina (MSSA) foram selecionados e armazenados em ultracongeladores a -80°C em glicerol a 10% para estudos posteriores.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Fez-se uma análise descritiva dos dados, e os resultados foram demonstrados através de tabelas de distribuição de frequências, gráficos e medidas paramétricas (BERQUÓ et al.,1980).

Para se verificar as eventuais associações entre as variáveis foram utilizados os testes Qui-Quadrado de Person e Exato de Fisher (ABRANGO, 2001). Para todas as comparações o nível de significância definido foi 5%.

3.5. GENÉTICA MOLECULAR

3.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Das 113 amostras (soma do grupo A e Grupo B) isoladas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas, foram selecionadas aleatoriamente 61 para as etapas de identificação molecular e investigação de genes responsáveis pela resistência à antibióticos. A extração de DNA genômico foi realizada pelo método Fenol/Clorofórmio de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), com modificações no Laboratório de Biotecnologia da UFAM e Laboratório da Fundação Osvaldo Cruz. .

Inicialmente, as amostras isoladas foram inoculadas em 5 mL do meio líquido Luria Bertani (LB) e cultivadas por incubação a 37° C por 18 horas com agitação a 150 rpm. Após crescimento, 4,0 mL da cultura foi centrifugada a 13.400 rpm por 3 minutos, o sedimento foi ressuspenso com 300 µL de Tampão TEN (0,05 M Tris-HCl pH: 7,5; 0,1M EDTA; 0,1 M NaCl), em seguida foi adicionado 1 µL de Lysostaphin (0,04 mg/mL) e incubado a 37 ° C por 20 min. Para completar a lise celular adicionou-se 50 µL de Triton X-100 10% e 20 µL de NaCl 3M , seguido de incubação a 60 ° C por 5 min, resfriando logo em seguida a temperatura ambiente. Após a incubação, foi acrescentado 10 µL de RNASE (10mg/mL) e incubado por 30 min a 37 ° C. Em seguida, foi adicionado 50 µL de SDS 10% e 3 µL de Proteinase K (10mg/mL) misturou-se e incubou-se a 37 ° C por 15 min. A extração de proteínas foi realizada com 1 V de fenol, as amostras foram agitadas gentilmente por 5 min, e centrifugadas a 13.400 rpm por 10 min. Após a formação de duas fases, foi recuperada a fase superior e acrescentado 450 µL de clorofórmio, agitou-se gentilmente por 5 min, em seguida foi centrifugado a 13.400 rpm por 10 min. Recuperou-se a fase superior, em seguida acrescentou-se 0,1V de NaCl 3M e 1 ml de etanol 100% (gelado) para precipitar o DNA. Após misturar-se várias vezes por inversão centrifugou-se a 13.400 rpm por 10 min a 4° C . O

sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70 %, seguido de centrifugação a 13.400 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol foi eliminado por evaporação em “speed vacuum” (Savant) por 15 min.

O DNA foi dissolvido em 50 - 100 μ L de tampão TE (0,01M Tris-HCl pH 8,0; 0,01M EDTA) e armazenado a -20 °C. A qualidade e a quantidade dos DNAs extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio ($1\mu\text{g. mL}^{-1}$).

3.5.2. AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE MENOR DO GENE 16S POR PCR E SEQUENCIAMENTO

A reação em cadeia da polimerase foi usada em dois momentos, um para amplificação do DNA codificador do RNA ribossômico 16S (SSUrDNA) e outro para amplificação de genes de resistência a antibióticos das linhagens isoladas de *S. aureus*. Em ambos os casos foi utilizado o conjunto de reagentes da Biotec Amazônia Ltda, seguindo as recomendações do fabricante e os iniciadores listados na Tabela 2. Para o controle positivo da PCR para SSU-rDNA foi utilizado o DNA bacteriano de *E. coli*. Os genes MEC A, MEC C, SPA e PVL foram amplificados conforme o protocolo estabelecido pela *European Union Reference Laboratory Antimicrobial Resistance* (EURL-AR), segunda versão, setembro 2012 (Stegger et al., 2012). A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose a 2% em TBE por 1 hora a 130 V.

Os amplicons do rDNA 16S foram sequenciados pelo método de Sanger e Coulson (1977), utilizando o conjunto de reagentes BigDye v 3.1 (Applied Biosystems - Thermo) nas condições recomendadas pelo fabricante. As sequências foram determinadas no Analisador Genético ABI 3500 (Applied Biosystems - Thermo).

3.5.3. FILOGENIA

A história evolutiva foi inferida pelo método da Máxima Verosimilhança, baseado no modelo Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980). A árvore consenso foi inferida a partir de 1000 replicatas analisadas pelo teste bootstrap (Felsestein, 1985). A análise evolutiva foi realizada no programa MEGA6 (Tamura, 1985).

Tabela 2: Iniciadores usados nesse trabalho

Primer	Sequência	Referência
<i>spa</i> -1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	EURL-AR 2819
<i>spa</i> -1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	EURL-AR 2820
<i>mecA</i> P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	EURL-AR 2821
<i>mecA</i> P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	EURL-AR 2822
pvl-F	GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATA	EURL-AR 2823
Pvl-R	GATAGGACACCAATAAATTCTGGA TTG	EURL-AR 2824
<i>mecA</i> _{LGA251} MultiFP	GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC	EURL-AR 2825
<i>mecA</i> _{LGA251} MultiRP	GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC	EURL-AR 2826
16S F	ACTCCTACGGRAGGAGCAG	Este trabalho
16S R	GGGACTACCAGGGTATCTAAT	Este trabalho
530F	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Este trabalho
1492R	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Este trabalho

* EURL-AR: *European Union Reference Laboratory Antimicrobial Resistance*. NA: não se aplica.

4. RESULTADOS

4.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Os 113 pacientes identificados e analisados com cultura positiva para *S. aureus* no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas foram divididos em dois grupos: A e B

Grupo A: 55 pacientes identificados no período de abril a agosto de 2005.

Grupo B: 58 pacientes identificados no período de agosto de 2010 a agosto de 2012.

Dos 113 pacientes analisados com cultura positiva para *S. aureus*, a maior incidência foi no sexo masculino 60% (grupo A) e 59 % (grupo B) respectivamente (Fig. 16). E as faixas etárias mais acometidas foram: grupo A 21-35 anos (27,3%), e mais de 65 anos (27,3%); e grupo B 36-45 anos (22,4%) (Fig. 17).

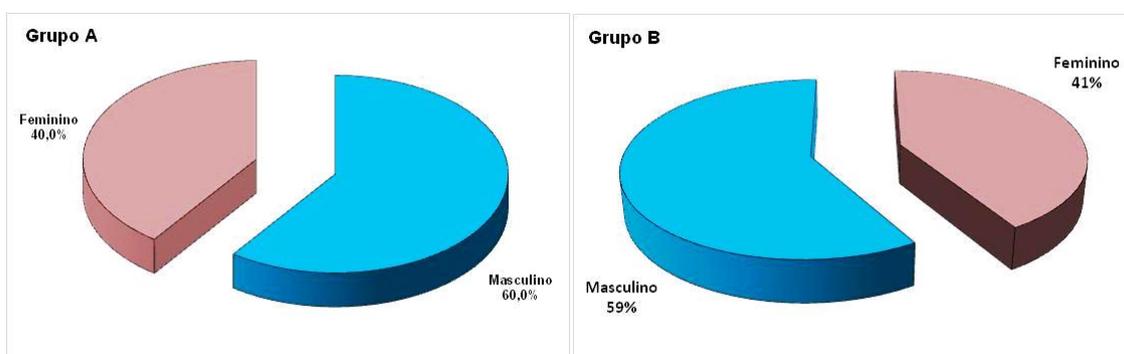


Figura 16: Distribuição por gênero da população com cultura positiva para *S. aureus* para os Grupos A (2005) e B (2010).

Dos 55 pacientes do grupo A, 46 (83,6%) estavam internados e apenas 9 (16,4%) receberam tratamento ambulatorial (Fig. 18). No grupo B todos os 58 pacientes (100%) estavam internados (p-valor = 0,00).

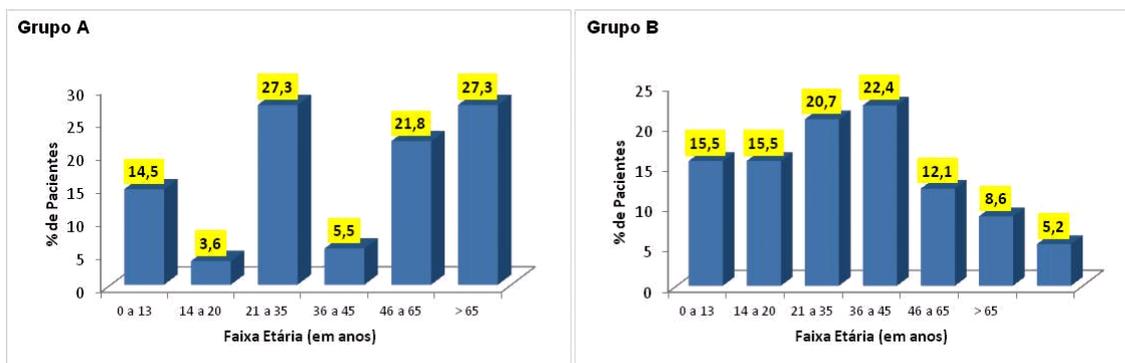


Figura 17: Distribuição por faixa etária da população com cultura positiva para *S. aureus* para os Grupos A (2005) e B (2010).

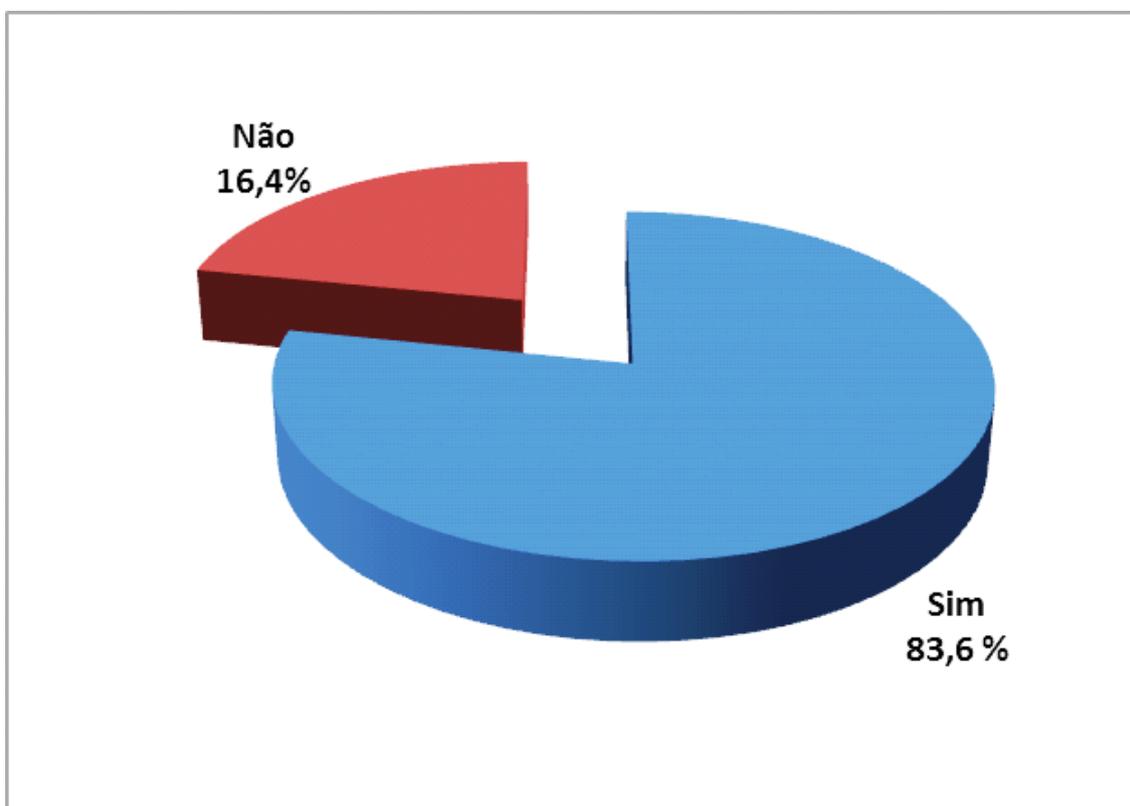


Figura 18: Distribuição dos pacientes com cultura positiva para *S. aureus* do Grupo A (2005). Em azul, a frequência de pacientes internados; em vermelho, a frequência dos pacientes que receberam tratamento ambulatorial.

A doença estafilocócica mais frequente, independente do grupo, foi a infecção de pele 34,5% e 77,6% (Tab. 3). E a pele também foi a principal porta de entrada nos dois grupos 56,4% e 77,6% (tabela 4).

Tabela 3: Distribuição por tipo de doença da população com cultura positiva para *S. aureus* para os Grupos A (2005) e B (2010).

Patogenia	Grupo A		Grupo B	
	FA*	%	FA*	%
Infecção de pele	19	34,5	25	43,1
Infecção de vias aéreas	18	32,7	12	20,7
Infecção generalizada	10	18,2	9	15,5
Infecção óssea	8	14,5	12	20,7
Total	55	100.0	58	100

*FA: Frequência absoluta.

Tabela 4: Distribuição por porta de entrada da população com cultura positiva para *S. aureus* para os grupos A e B.

Porta de entrada	Grupo A		Grupo B	
	FA*	%	FA*	%
Vias aéreas superiores	18	32,7	13	22,4
Pele	31	56,4	43	74,1
Catéter central	6	10,9	2	3,4
Total	55	100.0	58	100.0

*FA: Frequência absoluta.

4.2. PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

O resultado do antibiograma revelou um aumento na resistência aos antibióticos β -lactâmicos (ampicilinas e penicilinas) de 94,5% para 100% no intervalo de 5 anos e um aumento de cepas resistentes à meticilina de 47,3% para 96,6% no mesmo

período. Não foram identificados casos de resistência à vancomicina (Tab. 5 e 6 respectivamente).

Tabela 5: Resultado do antibiograma dos pacientes com cultura positiva para *S.aureus*, grupo A.

ANTIBIÓTICO	RESULTADO ANTIBIOGRAMA						TOTAL	%
	R ¹	% R	S ²	% S	I ³	% I		
Ampicilina	52	94,5	3	5,5	0	0,0	55	100,0
Cefazolina	27	49,1	28	50,9	0	0,0	55	100,0
Cloranfenicol	11	20,0	44	80,0	0	0,0	55	100,0
Ciprofloxacina	24	43,6	31	56,4	0	0,0	55	100,0
Clindamicina	23	41,8	32	58,2	0	0,0	55	100,0
Eritromicina	34	61,8	21	38,2	0	0,0	55	100,0
Gentamicina	25	45,5	30	54,5	0	0,0	55	100,0
Imipenem	26	47,3	29	52,7	0	0,0	55	100,0
Levofloxacina	21	38,2	31	56,4	3	5,5	55	100,0
Linezolid	0	0,0	46	100,0	0	0,0	46	100,0
Nitrofurantoína	11	20,0	44	80,0	0	0,0	55	100,0
Oxacilina	26	47,3	29	52,7	0	0,0	55	100,0
Penicilina	52	94,5	3	5,5	0	0,0	55	100,0
PIP-Tazo	1	4,3	22	95,7	0	0,0	23	100,0
Rifampicina	7	12,7	48	87,3	0	0,0	55	100,0
Synercid	2	4,3	44	95,7	0	0,0	46	100,0
Tetraciclina	23	41,8	28	50,9	4	7,3	55	100,0
Sulfa	20	36,4	35	63,6	0	0,0	55	100,0
Vancomicina	0	0,0	55	100,0	0	0,0	55	100,0
TOTAL	412	39,2	63,1	60,1	7	0,7	1.050	100,0

No grupo A, 16 pacientes eram portadores de *S. aureus* adquiridos na comunidade e não houve óbitos nesse grupo. Entretanto, dos 39 pacientes com *S. aureus* adquiridos no ambiente hospitalar 9 (23,1%) foram a óbito e dos 9 pacientes que faleceram 5 (55,6%) eram portadores de cepas MRSA (p-valor = 0,428). Já no grupo B, dos 58 pacientes acompanhados, 10 (17,24%) foram a óbito, e todos os 10 possuíam cepas de *S. aureus* MRSA (Tab. 7).

Tabela 6: Resultado do antibiograma dos pacientes com cultura positiva para *S. aureus*, grupo B.

ANTIBIÓTICO	RESULTADO ANTIBIOGRAMA				TOTAL	%
	Resistente	%	Sensível	%		
Ampicilina	58	100,0	0	0,0	58	100,0
Cefalotina	54	93,1	4	6,9	58	100,0
Ciprofloxacina	20	34,5	38	65,5	58	100,0
Clindamicina	23	39,7	35	60,3	58	100,0
Cloranfenicol	14	24,1	44	75,9	58	100,0
Eritromicina	34	58,6	24	41,4	58	100,0
Oxacilina	56	96,6	2	3,4	58	100,0
Penicilina	58	100,0	0	0,0	58	100,0
Rifampicina	14	24,1	44	75,9	58	100,0
Vancomicina	0	0,0	58	100,0	58	100,0
TOTAL	389	67,1	191	32,9	580	100,0

Tabela 7: Distribuição segundo a incidência de óbito de pacientes com cultura positiva para o *S. aureus* MRSA, grupos A e B.

ÓBITO	GRUPO A					GRUPO B				
	MRSA		MSSA		Total	MRSA		MSSA		Total
	FA	%	FA	%	FA	FA	%	FA	%	FA
Sim	5	55,6	4	44,4	9	10	100,0	0	0,0	10
Não	21	45,7	25	54,3	46	46	95,8	2	4,2	48
Total Pacientes	26	100,0	29,0	52,7	55	56	96,6	2	3,4	58

FA, frequência absoluta.

É extremamente importante que se ressalte a evolução da resistência do *S. aureus*, ao longo de 5 anos, revelada pelos números: no grupo A, dos 55 pacientes 26 (47,3%) eram portadores de cepas MRSA e 29 (52,7 %) de cepas MSSA (*S. aureus* sensível à meticilina), no grupo B, dos 58 pacientes, 2 (3,4%) possuíam cepas MSSA e 56 (96,6%) cepas MRSA (Fig. 19).

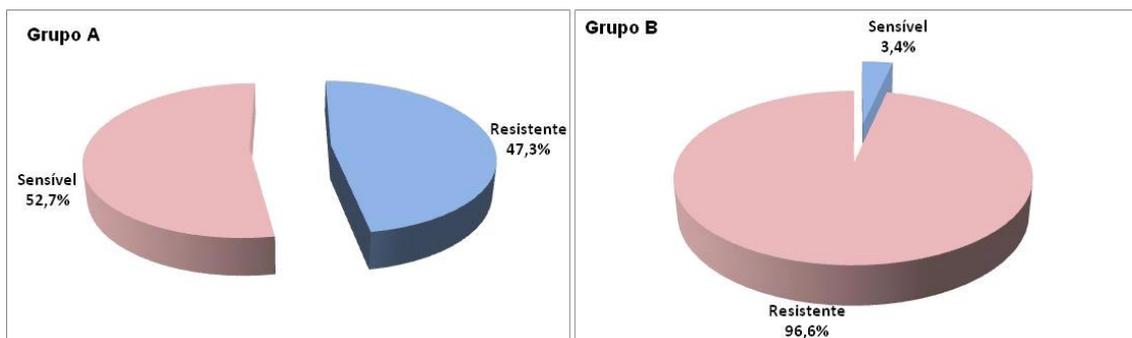


Figura 19: Incidência de cepas MRSA e MSSA entre os pacientes com cultura positiva para *S. aureus* para os Grupos A e B.

4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.

A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento direto de aproximadamente 1000 bp do gene que codifica para o RNA da subunidade menor do citoson ribossômico, os iniciadores foram desenhados de tal forma que pudessem flaquear as principais regiões variáveis (v1-v7). As sequências obtidas foram comparadas com as entradas do banco de dados de sequências não redundantes do INSCD (International Nucleotide Sequence Database Collaboration: GenBank, EBI e DDBJ), usando a ferramenta BLAST nos padrões da configuração BLASTN (Tabela 8 e 9).

Para a prospecção de genes de resistência por PCR com iniciadores específicos foram selecionadas 30 amostras resistentes aleatórias (MRSA) dos dois grupos (A e B) e 30 amostras sensíveis aleatórias (MSSA) (Tab. 8 e 9). Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose para determinação de ausência ou presença de amplicons com tamanho esperado (Fig. 20 e 21).

Considerando que as amostras que seguiram para a análise molecular já haviam sido identificadas pelos métodos convencionais de cultivo e halo, esperava-se uma correspondência entre as três metodologias empregadas, *i. e.* cultivo, PCR com iniciadores específicos e sequenciamento.

Entretanto as tabelas 8 e 9 trazem um resultado que em uma primeira análise parecem triviais na rotina de identificação, mas que podem trazer consequências sérias para a clínica médica. Para as amostras sensíveis (MSSA), por exemplo, das 30 amostras selecionadas, 9 não tiveram a identificação confirmada pelo sequenciamento. Dessas destacam-se a diferença em nível de gênero (S31A, S37, S216). Também é importante observar que houve amplificação positiva com o par de iniciadores SPA, supostamente específico para *S. aureus*, inclusive para espécies de outros gêneros como *Acinetobacter calcoaceticus* (S037) e *Bacillus cereus* (S216) (Fig. 20).

Nas amostras resistentes à meticilina (MRSA), a divergência entre identificação por cultivo e molecular ficou restrita ao gênero (Tab. 9). Desse conjunto de resultados, cabe destacar a ausência de amplificações para a amostra R08, identificada como *S. aureus* pelas duas técnicas já citadas (Fig 21).

Algumas amplificações com o par de iniciadores SPA falharam na primeira tentativa, uma vez que a amplificação com os iniciadores do 16S funcionaram, a possibilidade de inibição ou DNA degradado foi descartada. Assim, essas amostras foram submetidas a novo ciclo de amplificação, R8, R9, R10, R11, R12 e R19. Dessas, houve amplificação para as amostras R9 e R10 (imagem não mostrada). As demais não tiveram produtos detectáveis em nível de gel de agarose, para as amostras R11, R12 e R19 é o esperado, uma vez que são de outras espécies do gênero, entretanto para a amostra R8, a amplificação deveria ser positiva.

Tabela 8: Tabela de Análise Molecular das cepas MSSA

Isolados	PCR Iniciadores		Identificação molecular			
	Sensíveis	SPA	MecA P4 e P7	NCBI ID	Cobertura 1000 bp	% ID
S001	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S010	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S019	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S023	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S027	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S028	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S029	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S030	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S31A	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100%	0.0
S031	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S033	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	98%	0.0
S037	+	-	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100%	98%	0.0
S042	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S051	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S075	+	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	100%	100%	0.0
S118	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S130	+	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	99%	0.0
S164	+	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	99%	0.0
S181	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	98%	0.0
S190	+	-	<i>Staphylococcus sp. Ag08</i>	100%	100%	0.0
S216	+	-	<i>Bacillus cereus</i>	100%	98%	0.0
S232	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S244	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S247	+	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	100%	0.0
S289	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S308	+	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	99%	0.0
S322	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S325	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S396	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
S582	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0

+ Amplificação positiva; -, amplificação negativa.

Tabela 9: Tabela de Análise Molecular das cepas MRSA

Isolados	PCR		Identificação molecular			
	Iniciadores	MEC	NCBI ID	Cobertura 1000 bp	% ID	Evalue
Resistentes	SPA	A P4 e P7				
R001	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R002	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R003	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R004	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R005	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R006	+	+	<i>Staphylococcus warneri</i>	100%	100%	0.0
R007	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R008	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R009	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R010	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R011	-	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	100%	0.0
R012	-	+	<i>Staphylococcus sp</i>	100%	99%	0.0
R013	+	+	<i>Staphylococcus warneri</i>	100%	100%	0.0
R014	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R015	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R016	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	98%	100%	0.0
R017	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	98%	100%	0.0
R018	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R019	-	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	100%	0.0
R020	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R021	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R022	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R023	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R024	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R025	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R026	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R027	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R028	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	99%	0.0
R029	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0
R030	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%	0.0

+ Amplificação positiva; -, amplificação negativa.

4.4. AMPLIFICAÇÃO DO GENE MEC A

As 60 amostras foram testadas conforme recomendação da *European Union Reference Laboratory, Antimicrobial Resistance* (EURL-AR, 2012). Amostras MSSA, apresentaram resultados coerentes, ausência de amplificação, com exceção da S164 e S181. O esperado para esse teste seria negativo nas duas amostras, uma vez que S164 é *S. epidermidis* e S181 é *S. aureus*, sensível à meticilina (Fig. 20).

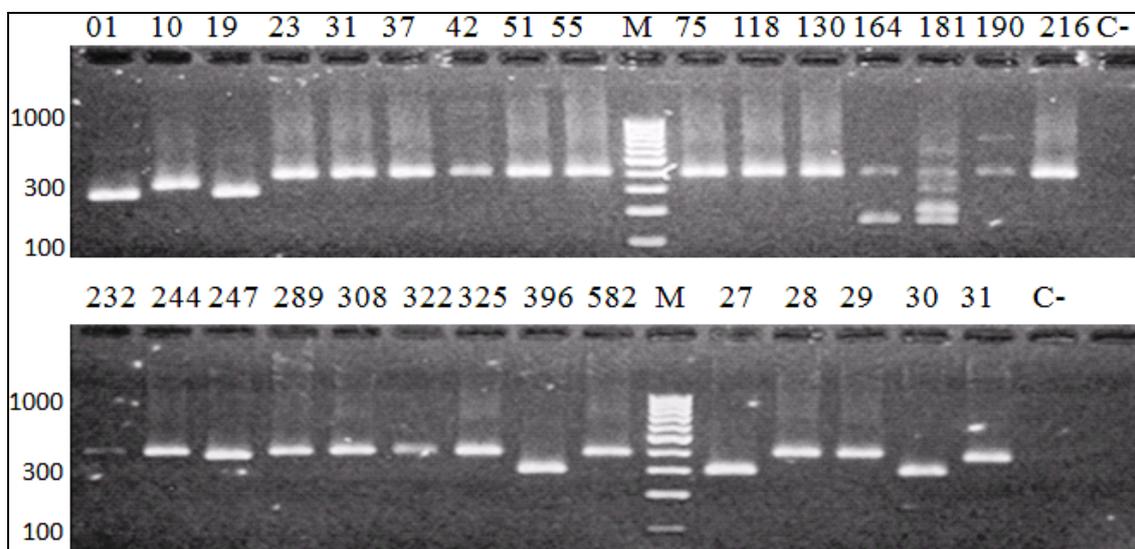


Figura 20: Perfil eletroforético de amplicons das cepas MSSA em gel de agarose 2%. Os números sequenciais representam as amostras. M, padrão de tamanho de banda (100 bp DNA Ladder), os números à esquerda indicam a posição relativa de três tamanhos de moléculas de DNA, 100, 300 e 1000 bp. C-, controle negativo da reação de PCR, água ultrapura no lugar de DNA. Os amplicons em torno de 300 bp, referem-se ao par de iniciadores SPA. Os amplicons em torno de 162 bp, referem-se ao gene MecA

Para as amostras MRSA, a maioria teve amplificação positiva para o gene MecA, com exceção das amostras R8, R9, R10, R25, R26 e R27 (Fig 21). Dessas, a amostra R8 já não havia amplificado com os iniciadores do gene SPA. Entretanto, todas

tiveram a resistência confirmada pelo antibiograma, o que sugere um mecanismo de resistência não dependente do MecA.

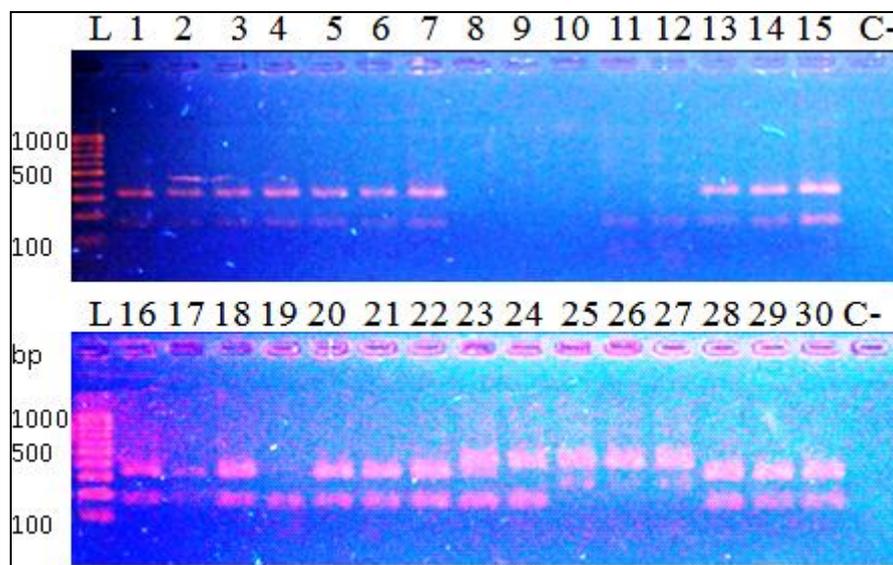


Figura 21: Perfil eletroforético de amplicons das cepas MRSA em gel de agarose 2%. Os números sequenciais representam as amostras. L, padrão de tamanho de banda (100 bp DNA Ladder), os números à esquerda indicam a posição relativa de três tamanhos de moléculas de DNA, 100, 500 e 1000 bp. C-, controle negativo da reação de PCR, água ultrapura no lugar de DNA. Os amplicons em torno de 300 bp, referem-se ao par de iniciadores SPA. Os amplicons em torno de 162 bp, referem-se ao gene Mec.

4.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA.

As sequências obtidas para cada um dos isolados foram agrupadas inicialmente seguindo o critério de identidade ao nível de 100% para o alinhamento global múltiplo. As sequências que não se agruparam foram mantidas isoladas. Para cada um desses grupos foi obtida a sequência consenso. As sequências consenso e as sequências isoladas foram comparadas com as sequências depositadas no INSDC através da ferramenta BlastN. Do resultado escolheu-se os *best hits* para inferir a relação filogenética entre os isolados dos subgrupos resistente e sensível. Esse procedimento foi usado para as cepas MSSA (Fig. 22) e MRSA (Fig. 23)

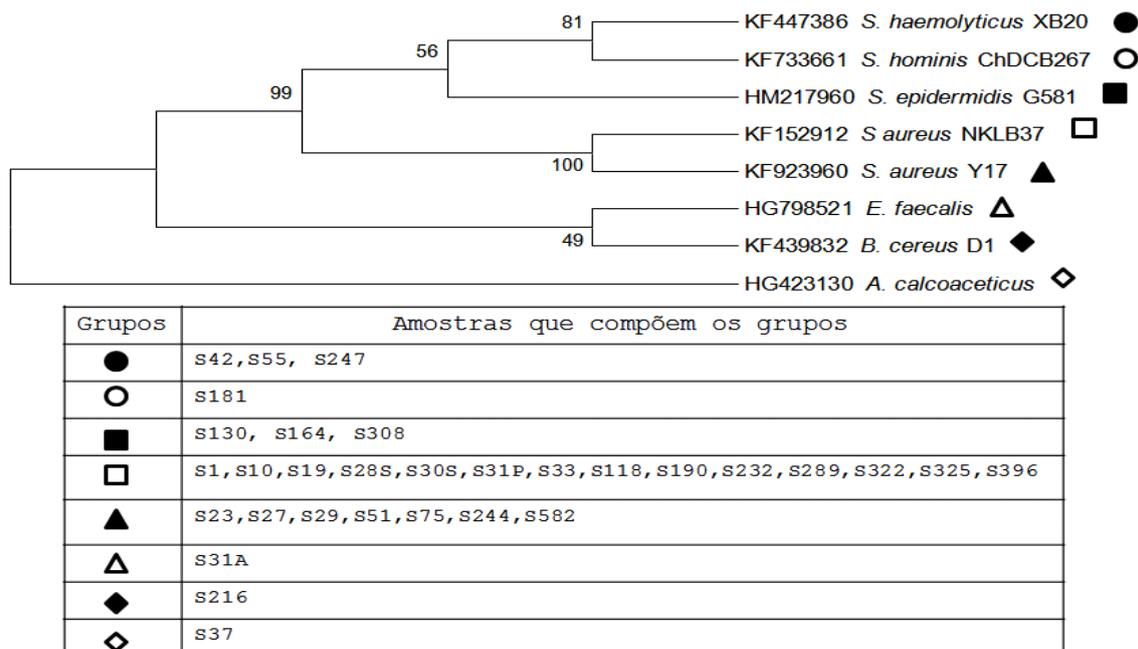


Figura 22: Análise filogenética das amostras MSSA pelo método de Máxima Semelhança. A historia evolutiva foi inferida usando-se o modelo Kimura 2 parâmetros. O teste estatístico baseado em 1000 replicatas. Os braços com menos de 50% foram agrupados. Os números próximos aos braços representam a porcentagem que as entradas se agruparam para as 1000 replicações. A análise envolveu 8 sequências de nucleotídeos representativas de cada grupo gerado pelo alinhamento global. Todas as posições contendo falhas e ausências de dados foram eliminadas. Ao final de cada braço consta o número de acesso INSDC da sequência representativa. Figuras geométricas abertas ou fechadas foram usadas para facilitar a visualização dos grupos na árvore. A análise evolutiva foi conduzida num MEGA6.

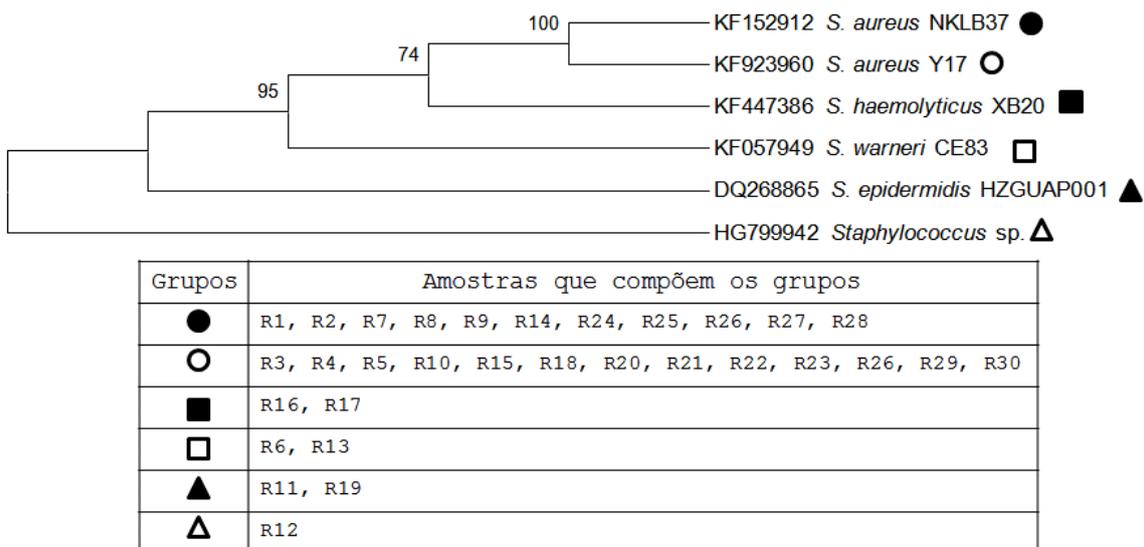


Figura 23: Análise filogenética das amostras MRSA pelo método de Máxima Semelhança. A historia evolutiva foi inferida usando-se o modelo Kimura 2 parâmetros. O teste estatístico baseado em 1000 replicatas. Os braços com menos de 50% foram agrupados. Os números próximos aos braços representam a porcentagem que as entradas se agruparam para as 1000 replicações. A análise envolveu 6 seqüências de nucleotídeos representativas de cada grupo gerado pelo alinhamento global. Todas as posições contendo falhas e ausências de dados foram eliminadas. Ao final de cada braço consta o número de acesso INSDC da seqüência representativa. Figuras geométricas abertas ou fechadas foram usadas para facilitar a visualização dos grupos na árvore. A análise evolutiva foi conduzida num MEGA6.

Os dados moleculares das cepas MRSA e MSSA foram ainda agrupados para se verificar se existiam genótipos que ocorriam nas duas classes. Obviamente, essa comparação ficou restrita a aproximadamente 1000 bp do gene que codifica para a subunidade menor do RNA ribossômico, entretanto ainda é usado como um bom indicador filogenético. Fica evidente que alguns genótipos ocorrem nas duas classes, como os representados pelos números de acesso KF447386, KF152912, e KF923960 (Fig 24).

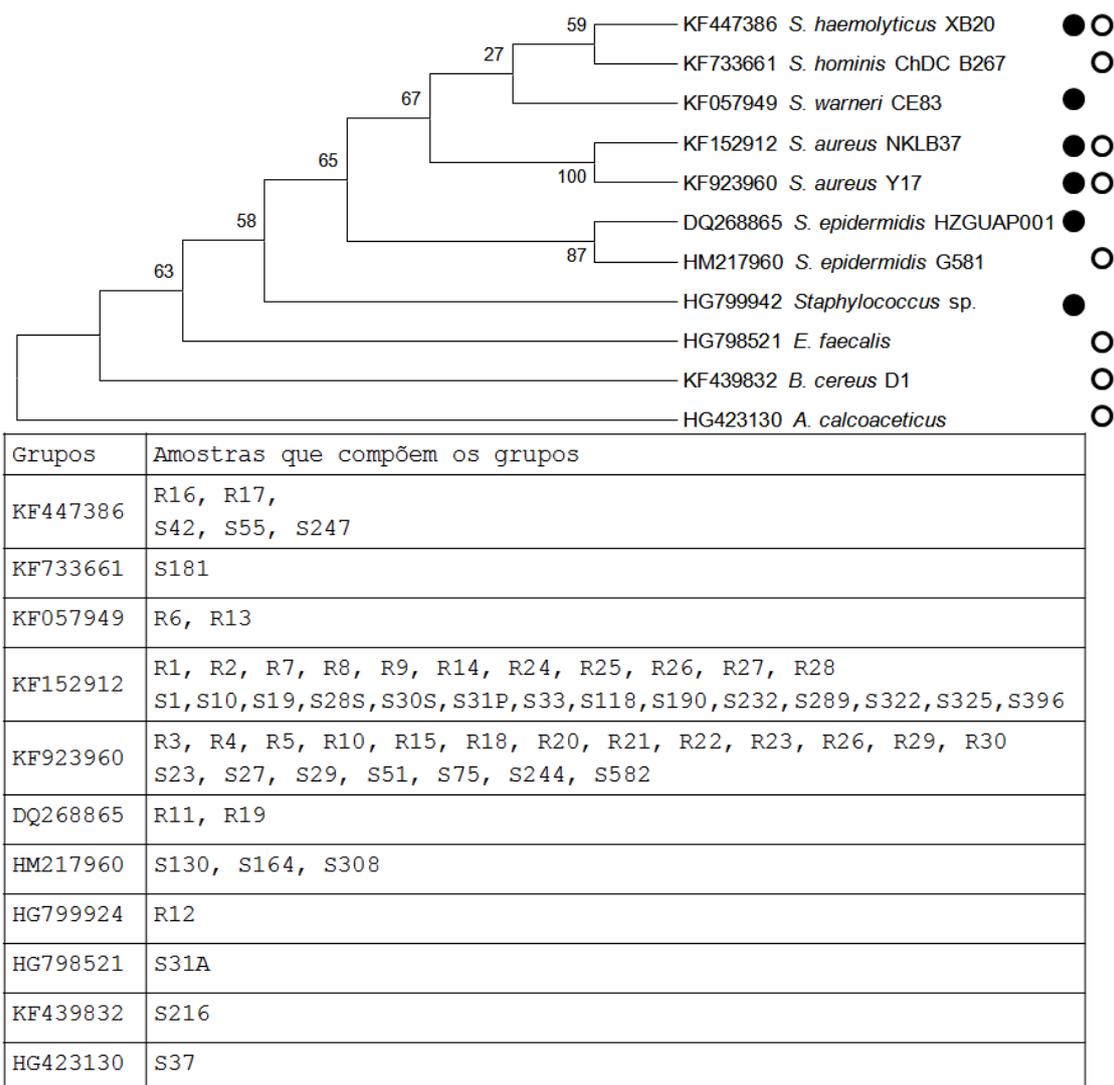


Figura 24: Análise filogenética das amostras MRSA pelo método de Máxima Semelhança. A historia evolutiva foi inferida usando-se o modelo Kimura 2 parâmetros. O teste estatístico baseado em 1000 replicatas. Os braços com menos de 50% foram agrupados. Os números próximos aos braços representam a porcentagem que as entradas se agruparam para as 1000 replicações. A análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos representativas de cada grupo gerado pelo alinhamento global. Todas as posições contendo falhas e ausências de dados foram eliminadas. Ao final de cada braço consta o número de acesso INSDC da sequência representativa. Os círculos fechados representam genótipos encontrados nas cepas MRSA, já os círculos abertos, os genótipos encontrados nas cepas MSSA. A análise evolutiva foi conduzida num MEGA6.

5. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) representa uma grande ameaça à saúde pública em todo o mundo. Na América Latina, o número de estudos epidemiológicos com base em dados moleculares dos diversos isolados MRSA é pequeno. Entretanto os dados relacionados à virulência, resistência bacteriana e distribuição geográfica sugerem um alto grau de plasticidade genética o que torna importante a caracterização dos polimorfismos para que sejam formuladas estratégias terapêuticas locais apropriadas, principalmente no que diz respeito à escolha do antibiótico mais adequado e elaboração de plano estratégico para controle de propagação dos clones de MRSA na região (RODRIGUEZ-NORIEGA E SEAS, 2010).

No Brasil *S. aureus* é um dos principais responsáveis pelas infecções nosocomiais. O isolamento expressivo de cepas MRSA é apontado como um dos principais responsáveis pelo aumento dessa prevalência que chega a atingir níveis entre 40% a 80% nos hospitais brasileiros (OLIVEIRA et al., 2001 e OLIVEIRA et al., 2014).

No cenário em Manaus não é diferente. Em 2005 foram 26 isolados confirmados (47,3 %) e, em apenas cinco anos, a frequência dobrou, foram 56 isolados confirmados como cepas MRSA (96,6%). Nesse período, a distribuição das infecções entre o sexo feminino e masculino (Fig. 16) manteve-se estável com uma incidência maior para o sexo masculino. Esse resultado pode ser explicado pela maior exposição do sexo masculino a eventos traumáticos

Em relação à faixa etária (Fig. 17), o cenário ainda não está claro, uma vez que temos seis classes representativas das fases cronológicas e o número amostral de cada grupo pode não ter sido suficientemente representativo para todas as fases. Para tentar ver a tendência central da amostragem global, a análise conjunta dos dados dos dois

grupos indica que cada classe cronológica contribui com 17% das infecções em média, com um desvio padrão de $\pm 0.05\%$ (Anexo III). Trabalhos futuros na mesma linha certamente contribuirão para uma visão mais clara de como as infecções estão distribuídas na população de Manaus. Entretanto, cabe observar que as infecções, entre as classes de ambos os grupos, separados ou em conjunto, foram mais incidentes em duas faixas etárias 21-45 anos (fase mais produtiva e mais afeita a eventos traumáticos): grupo A 18 (32,8%) e grupo B 25 (43,1%); e mais de 65 anos (fase mais afeita a doenças crônicas como: insuficiência renal crônica, diabetes, neoplasias, úlceras vasculares, etc.): grupo A 15 (27,3%) e grupo B 8 (13,8%).

As infecções de pele seguida da infecção de vias aéreas, principalmente pneumonia, foram às formas mais recorrentes de infecção (Tab. 3 e 4). Esse dado é importante pelo alerta que ele trás: (1) o cuidado com a higiene da pele, principalmente nos serviços de saúde onde a frequência de manipulação de pacientes por diversos profissionais é muito alta, o que favorece a contaminação cruzada; (2) o risco de broncoaspiração em pacientes com dieta enteral e pacientes hipersecretivos acamados, o que favorece o desenvolvimento de pneumonias aspirativas; (3) o uso indiscriminado de antibióticos em qualquer Infecção de Vias Aéreas Superiores; (4) e lembrar que *S. aureus* é um comensal a espera de alguma falha no funcionamento do organismo para adentra-lo e causar todos os seus malefícios.

Vale ressaltar ainda que no primeiro estudo, dos 55 pacientes, 26 estavam infectados por cepas MRSA e 29 estavam infectados por cepas MSSA. Dos 26 pacientes infectados por cepas MRSA, 5 foram a óbito e dos infectados por cepas MSSA, 4 foram a óbito. Já no segundo estudo, dos 58 pacientes, 10 pacientes foram a óbito (Tab. 7) e todos os óbitos foram por cepas MRSA. A pneumonia, a infecção generalizada e a infecção óssea foram as causas de morte mais comum nos dois grupos

(Anexo IV). O que esses dados sugerem é que o(s) clone(s) MRSA de Manaus esta(ão) se disseminando pela população de forma rápida, entretanto, apesar de o número de óbitos ser expressivo, a letalidade das cepas parece não acompanhar de forma proporcional o aumento das infecções.

Os dados são coerentes quando se observa o incremento das infecções causadas por cepas MRSA de 47,3% em 2005 para 97% em 2012, pois as cepas MSSA que em 2005 correspondiam a 52,7%, não superaram os 3% em 2012. Assim sendo, esses resultados comprovam o real aumento das infecções causadas por cepas MRSA (Fig. 19) como descritos por Correal et al., em 2013 e Oliveira et al., em 2014.

Além das infecções hospitalares registra-se a rápida ascensão de cepas MRSA de origem comunitária (CA-MRSA) (O'Brian et al., 1999 e Oliveira et al., 2014). Apesar de a expressão comunitária induzir a ideia de uma cepa menos virulenta, cabe alertar que também estas são capazes de causar infecções graves, o que agrava mais ainda o a situação atual. Assim, a rápida e precisa detecção das cepas MRSA é extremamente importante para que se institua uma terapêutica antibiótica apropriada e imediata, cujos objetivos são a cura da infecção, prevenção de sequelas como amputações (por necroses de membros), pneumectomias, lobectomias por necroses pulmonares, aumento do tempo de internação hospitalar e óbitos por septicemia, bem como, a redução da chance de disseminação da cepa no ambiente hospitalar. Identificação rápida e intervenção imediata quer dizer que o médico tem menos de 24 horas a partir da identificação clínica da infecção para a tomada de decisão.

Todavia, como identificar de forma rápida e precisa cepas MRSA? A identificação em nível de espécie não é tarefa fácil. Nas décadas posteriores ao advento da PCR e sequenciamento gênico, entre outras metodologias moleculares, houve uma migração em massa para esse campo e por algum tempo foi possível a diferenciação ou

identificação de espécies muito proximamente relacionadas, mas nos dias atuais, até mesmo metodologias muito recentes para os fins de identificação de amostras clínicas (MALDI-TOF, PFGE) tem demonstrando limitações, que são frequentemente reportadas na literatura (Wolter et al., 2011; SenGupta, et al.; 2014; Lasch, et al. 2014).

Essas limitações explicam as divergências encontradas na determinação da espécie mediante emprego do sequenciamento gênico. Obviamente, não se pode descartar a possibilidade de contaminação pós-identificação por cultivo, como nos casos encontrados para outros gêneros (S31A, S37 e S216), entretanto, a dificuldade de discriminação intraespecífica não apenas é muito provável, como também muito frequente, assim, sabendo que apenas *S. aureus* produz o halo amarelado, a combinação dessas duas metodologias, nos permite concluir que, apesar da divergência entre os métodos molecular e dependente de cultivo, são todos *S. aureus*, e que a divergência resulta da limitação de ambas as técnicas isoladas.

O que a hipótese da limitação de técnicas não explica é o fato da divergência entre gêneros aparecer apenas nas amostras MSSA. Nesse ponto, duas possíveis linhas a serem investigadas seria (1) a confirmação ou refutação da hipótese de contaminação; (2) plasticidade genotípica por transferência horizontal de genes.

A hipótese da plasticidade genotípica é interessante, primeiro porque é fartamente reportada na literatura, segundo porque a pressão seletiva exercida pelos antibióticos certamente reduz a diversidade bacteriana no grupo das amostras resistentes (GOERK e WOLZ, 2004; ZIEBANDT et al., 2010).

Os dados moleculares são interessantes porque sugerem que ou o par de iniciadores não é específico para a espécie *S. aureus*, ou é específico e o sequenciamento gênico apenas do rDNA 16S não é mais suficiente para discriminar espécies proximamente relacionadas. Ainda assim, a amplificação positiva para

espécies como *Acinetobacter calcoaceticus* (S037) e *Bacillus cereus* (S216) (Tab. 8 e Fig. 20) reforçam a necessidade de estudos mais aprofundados com esse par de iniciadores, pois não são espécies proximamente relacionadas a *S. aureus*, como evidencia a história filogenética dessas espécies (Fig. 22).

A problemática de identificação em nível de espécie, do ponto de vista prático na clínica e terapêutica é subjacente à determinação do perfil de resistência do agente etiológico aos antibióticos. Esse ponto é crucial para o sucesso da intervenção médica. Quanto mais precoce for a abordagem terapêutica, maiores são as chances de sucesso na profilaxia de complicações severas, pois essas linhagens são capazes de causar infecções que vão desde abscessos cutâneos até fascíte e pneumonia necrotizantes com o iminente risco de vida para os pacientes (RODRIGUEZ-NORIEGA e SEAS, 2010 e CORREAL et al., 2013).

A gravidade das infecções pode variar entre os isolados, pois está relacionada à produção de fatores de virulência como produção de toxinas e biofilmes protetores. A plasticidade fenotípica associada à capacidade de propagação das cepas MRSA, sugerem forte influência da plasticidade genética no sucesso adaptativo e arsenal de defesa de *S. aureus* ao sistema imune do hospedeiro e às mais diversas drogas usadas na atualidade (RODRIGUEZ-NORIEGA e SEAS, 2010 e SENGUPTA et al., 2014).

O sucesso na adaptação desse patógeno ao hospedeiro mediado pela plasticidade genética é explicado pela criação de mecanismos reguladores em curto prazo e por fatores genéticos hereditários na população em longo prazo ou até mesmo pela transferência horizontal de genes mediada por fagos (GOERK e WALZ, 2004; SENGUPTA et al., 2014).

Nesse sentido, a identificação molecular em nível de sequenciamento gênico do 16S rDNA, pode ter uma importância nos estudos evolutivos e de diversidade, mas

pouco contribuem para a praxis médica, uma vez que isolados com 100% de identidade em relação a esse gene (Fig. 24) podem apresentar perfis de resistência distintos em virtude da plasticidade genética apresentado pelo *S. aureus*, cujo genoma acessório varia de 25 a 30% (SHITTU et al., 2007).

Dois perfis chamam e se destacam em relação à amplificação do gene *MecA*. Primeiro, houve amplificação para as cepas S164 e S181 (Fig. 20). A identificação molecular determina que a cepa S164 é *S. epidermidis*, entretanto, como já discutido, muito provavelmente se trata de *S. aureus*. Independente da espécie de fato, as duas cepas foram sensíveis à meticilina, porém apresentam o gene de resistência *MecA*. Segundo, as cepas R08, R09, R10, R25, R26 e R27, todas com perfil de resistência segundo o antibiograma, não amplificaram o gene *MecA* (Fig. 21).

Para explicar essa aparente divergência precisamos considerar que, para as amostras sensíveis, a detecção do gene *MecA* não garante que este esteja sendo expresso, e mesmo que esteja sendo expresso, não é possível afirmar que o produto é funcional, uma vez que a análise em nível de sequência gênica não foi realizada no presente estudo. Essa argumentação é coerente com a detecção do gene, mas não à sua função. Já para as amostras resistentes, cuja amplificação foi negativa, uma possível explicação é que nesses casos, a resistência a meticilina é independente do gene *MecA*, uma vez que outros mecanismos já foram descritos na literatura.

Até recentemente a detecção do gene *MecA* (que é transportado por um elemento genético móvel) em isolados de *S. aureus* era o padrão ouro para a identificação de cepas MRSA. Entretanto, sabe-se hoje que existem diversos homólogos do SCCmec (I, II, III, ..., XI) e a hipótese é que possam existir homólogos do gene *mecA*, ou ainda genes não descritos que confirmam resistência à meticilina. Coerente com essa hipótese, em 2012, foram descritos isolados de *S. aureus* a partir de bois e humanos

um gene homólogo ao *mecA*, denominado *meC* ou *mecA_{LGA251}*. Esse gene é transportado pelo SCCmec XI e possui 70% de identidade de nucleotídeos com o gene *MecA* (STEGGER, 2012).

O antibiograma é inequívoco, o fenótipo resistência para essas amostras existe, e o mecanismo genético carece de explicação. São necessários mais estudos para determinar exatamente se estas cepas possuem algum homólogo SCCmec conhecido, ou ainda se se trata de um homólogo não descrito na literatura, algo que contribuiria para o ineditismo do presente trabalho.

Nesse estudo não se detectou *S. aureus* resistente à vancomicina, porém, o histórico da evolução do espectro de resistência por seleção artificial, promovida pela pressão seletiva em virtude do uso de antibióticos permite inferir que é só uma questão de tempo. Nesta eventual ocasião a pergunta que a comunidade médica terá dificuldade em responder será: o que fazer para tratar os pacientes acometidos por essa bactéria em Manaus? E em todo o mundo?

Uma tentativa de resposta foi dada pela Organização Mundial da Saúde em 2014. Especialistas da OMS analisaram dados epidemiológicos de 129 países e concluíram que a humanidade está se aproximando da era pós-antibióticos e nesse novo cenário, doenças que hoje são tratadas de forma eficiente com os antimicrobianos atuais voltarão a ser letais (OMS, 2014).

Frente a esse quadro grave e extremamente preocupante há a necessidade de intervenção imediata da comunidade médica e científica. Os pontos críticos a serem abordados devem ser: (1) O estabelecimento de diretrizes nacionais pelo Ministério da Saúde de combate às infecções hospitalares; (2) Discussão das diretrizes nacionais e estruturação das políticas regionais de combate às infecções hospitalares em especial às causadas por *S. aureus*; (3) Ações enérgicas das Comissões de Controle de Infecção

Hospitalar (CCIH) que englobem entre outras medidas, (3.1) Programa de educação continuada e monitoramento do comportamento da equipe de saúde quanto aos cuidados de antissepsia não apenas das mãos, mas uso de celulares e objetos pessoais que possam se tornar repositórios de cepas patogênicas, (3.2) Uso inapropriado de jalecos em ambientes estranhos ao setor de internação ou a adoção de jalecos descartáveis na abordagem do paciente; (4) Desenvolvimento de exames mais precisos para a identificação em nível de espécie e determinação do espectro de resistência em um período não superior à 24h desde a indicação médica até a indicação da antibioticoterapia mais apropriada e (5) programa de vigilância permanente pronto para identificar e/ou monitorar novos clones multi ou panresistentes.

Os riscos apontados nesse trabalho e a velocidade reportada quanto à capacidade adaptativa e seleção de cepas resistentes de *S. aureus* permite afirmar que não se pode negligenciar o desafio, pois as consequências para o futuro próximo podem ser devastadoras. Assim sendo, fica o desafio à comunidade acadêmica, não apenas para se determinar de forma precoce (inferior a 24 horas) perfil de resistência de um isolado a partir do foco de infecção, mas também para se determinar de forma profilática a existência de determinados clones de resistência seja no ambiente hospitalar, seja na comunidade, o que permitiria agir por antecipação na prevenção das infecções hospitalares.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo é inequívoco ao afirmar que em Manaus, o perfil de resistência de *S. aureus* aos antibióticos já é o mesmo existente ao redor do planeta. Além disso, não existe um protocolo que auxilia o médico na tomada de decisão frente a casos de infecção com *S. aureus*. Também não existe um exame efetivo, em custo e tempo, que permita uma identificação específica em nível de espécie e perfil de resistência que subsidie a decisão médica quanto à conduta terapêutica mais adequada. Em conjunto, os dados e discussão apontam para a necessidade de uma ação conjunta do poder público e comunidade científica para:

- 1 – definir um protocolo padrão para a tomada de decisão em relação à conduta terapêutica mais adequada;
- 2 – Desenvolver um método diagnóstico confiável em nível de espécie e perfil de resistência cujo resultado esteja disponível em até 24h após a solicitação, tempo em que a conduta médica fornece um bom prognóstico para a evolução do tratamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANGO, H.G. **Bioestatística Teórica e Computacional**. Ed. Guanabara Koogan, 2001.

ANTINORI, C.H.; VILLANUEVA, D.T.; PIERUCCI, Jr. L. A new approach to the management of infected pacemakers. *Clin Cardio*, v. 17, p. 38-40, 1994.

ARBER, R.C. ; MACKEL, D.C. Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. *Am J Med*, v.70, p. 901-905, 1988.

ARBUTHNOTT, P.; COLEMAN, DC. ; DE AZEVEDO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. *The Staphylococci: and introductions. The Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, p. 101-107, 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 61, p. 1-10, 2000.

BANERJEE, SN, EMORY TG, CULVER DH et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the united States, 1980-1989. *Am J. Med* 1991; 91: Suppl 3B : 3B – 86s – 3B – 89 S.

BAORTO,E.P.; BOARTO, D. *Staphylococcus aureus* infection. Columbia University Medical Center, 2004.

BARBER, M. Methicilin-resistant staphylococci. *Journal of Pathologic Clinical*, v.14, p. 385-393, 1961.

BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BERGDOLL, B. M. Analytical methods for *S. aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 10, p.91-100, 1990.

BERQUÓ, E.S; SOUZA, J.P; GOTLIEB, L.D. *Bioestatística*. São Paulo : EPU, 1980.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Reviews*, v. 55, p. 733-751, 1991.

BIEDENBACH, D.J. et al . Ocurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from de SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002).Diagn.Microbiol.Infec. Dis., Philadelphia,v.50, n.1, p.59-69, sep.2004.

BOHACH , G.A.; FAST, D.J.; NELSON, R.D.; SCHILIEVER, P.M. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illness. Critical Reviews Microbiology, v. 17, p. 251-272, 1990.

BONE, R.C. Gram - positive organisms and sepsis. Achieves International Medical, v. 154, p. 26 – 34, 1994.

BOYCE, J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology and preventive measures. Infect Control Hosp Epidemiology, v. 12, p. 735-737, 1992.

BRANCHINI, M.L.M.; MORTHLAND, V.H.; TRESOLDI, A.T. Application of genomic DNA sub typing by pulsed-field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. Diag Microbiol Infect Dis, v. 17, p. 275-281, 1993.

BRATU S. et al. A population-based study examining the emergence of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 in New York City . Ann Clin Microbiol Antimicrob,v.5,n.29,2006

BROCK,T.D. Milestones in Microbiology. American Society for Microbiology, 1975.

CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). Revista de Microbiologia, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 320-323, 1990.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology, v. 14, p. 09-14, 2002

CASEWELL, M.W.; HILL, RLR. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobiology Chemotherapy, v. 18, p. 1 – 12, 1986.

CASEY, L.C.; BALK, R.A. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Anais Internacionais de Medicina*, v. 119, p. 771-778, 1993.

CDC. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin – United States: 1997. *MMWR*, August 22, v.46, n.33, p.765-766, 1997.

CDC. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin – United States: 1997. *MMWR*, September 05, v.46, n.35, p.813-815, 1997.

CDC. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin — Illinois: 1999. *MMWR*, January 07, v.48, n. 51, p. 1165-1167, 2000.

CDC. Interim Guidelines for Prevention and Control of Staphylococcal Infection Associated with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *MMWR*, July 11, v.46, n.27, p.626-628, 635, 1997.

CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States : 2002. *MMWR*, n.5, v.1, p.565-7.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS PUBLIC HEALTH , 2014

CHAIN E, LOREY HW, GARDNER AD, HEATLEY NG, JENNINGS MA, ORR-EWING J.; SANDERS, AG Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, v.2, p.226-228. *Tu: Microbiology : A Centenary Perspective*, edited by Wolfgang K. Joklik, ASM Press, p.112, 1999.

CHESNEY, P.J.; DAVIS, J.P.; WAND, P.J.; CHESNEY, R.W.; Clinical manifestations of toxic shock syndrome. *Jama*, v. 246, p. 741-748, 1981.

CHEUNG, A.L.; FISHETTI, V.A. The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, v. 161, p. 1177 – 1186, 1990.

CHUNG, H.J. et al. Epidemiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with eczematous atopic dermatitis lesions. *J. Clin. Microbiol.* 2008.

COREY GR. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: definitions and treatment. *Clin Infect Dis* ,v.48 (Suppl 4) : p. 254-9, 2009.

CORREAL JCD. et al. *Staphylococcus aureus* infections: change in epidemiology at Pedro Ernesto University Hospital. *Revista HUPE*, Rio de Janeiro, 2013; 12 (3) : 31-46.

CRIBIER, B.; PIEMONT, Y. ; GROSSHANS, E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults: a clinical review illustrated with a case 3. *Dermatology*, v. 30, p. 319-324, 1984.

CUI, L.; MA, X. ; SATO, K.; OKUMA, K.; TENOVER, F.C.; MAMIZUKA, E.M.; GEMMEL, C.G. ; KIM, MI-NA; PLOY, M.C ; N. EL SOTH; FERRAZ, V.; HIRAMATSU, K. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *S. aureus*. *J. Clin. Microbiol.* v. 41, p.5-14, 2003.

DAMASCO et al. of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* related to sequence type Involvement 25 and harboring *pvl* genes in a case of carotid cavernous fistula after community-associated sepsis *J Clin Microbiol.*; 50 (1) : 196, 2012.

DELGADO JC, MARQUES EA, WERNECK GL. Epidemiologia das infecções causadas por *S. aureus* resistentes a meticilina com perfil comunitário (CA-MRSA) em pacientes atendidos em um hospital terciário no Rio de Janeiro. Dissertação. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós – graduação em Ciências Médicas , 2011.

DEPLANO A et al. Multicente Evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCAMID. *J. Clin. Microbiol.* V.38, p.3527-3533, 2000.

DIXON, B. ; POWERUNSEEN : How Microbes Rule de World. W.H. Freemanf Spektrum Publishing ,1994.

DOMINGUEZ MA; DE LENCASTRE H.; LINARES J.;TOMASZ A. Spread and maintenance of a dominant methicilin-resistant *S. aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J. clin. Microbial.* 32; 2081-7, 1994.

DRUBA J, SENGUPTA, LISA A. CUMMINGS, DANIEL R. HOOGESTRAAT, SUSAN M. BUTLER-WU, BRAD T. COOKSON, STEPHEN J. SALIPANTE. Whole-Genome Sequencing for High- Resolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemiology and Genome Pasticity.*Journal of Clinical Microbiology.*v.52, p.2787-2796, 2014.

ELECK, S.D.; CONEN, P.E. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man: a study of the problems of wound infection. *Britanical Journal of Pathology*, v.38, p.573-586, 1957.

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY, ANTIMICROBIAL RESISTANCE (EURL-AR), 2012.

FEKETY, Jr. F.R. The epidemiology and prevention of staphylococcal infection. *Medicine*, v. 43, p. 503-613, 1964.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791, 1985.

FERNANDEZ-GUERRERO, M.L.; VERDEJO, C.; AZOFRA, J.; DE GÓRGOLAS, M. Hospital-acquired infectious endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. *Clinical Infectious Disease*, v. 20, p. 16-23, 1995.

FERNANDEZ-GUERRERO, M.L.; VERDEJO, C.; AZOFRA, J.; DE GÓRGOLAS, M. Hospital-acquired infectious endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. *Clinical Infectious Disease*, v. 20, p. 16-23, 1995.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with a special reference to their use in the isolation of *H. influenza*. **Brit J Exp Path** v.10, p. 226-236, 1929. In **Microbiology: A Centenary Perspective**, edited by Wolfgang K. Joklik,

ASM Press. 1999, p.98 and also in : **Milestones in Microbiology** : 1556 to 1940, translated and edited by Thomas D. Brock, ASM Press, p. 185, 1998 .

FOSTER tj. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* ; 3:948-58, 2005.

FOSTER,T.J.; MCDEVITT, D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence.*FEMS Microbiology Letters*,v.118, p.199-205, 1994.

FOWLER T, WANN ER, JOH D, JOHANSSON S, FOSTER TJ, HOOM M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* V.79, 672-9, 2000.

FOWLER,V.G.J. et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis : a consequence of medical progress. *JAMA*, Chicago, v.293, n.24, p.3012-3021, jun.2005.

FRANCOIS, P et al. Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin- S. aureus. *J. Clin.Microbiol.*Washington, v.45, n.6, p.2011-2013, jun.2007.

FREIRAS, M.F.L; LEAL BALBINO, T.C.; MOTA, R.A. ; SATAMFORD, T.L.M. Exotoxinas estafilococicas. *Ciênc. Vet. Trop.* v.7, n.2 e 3 , p.63-74, 2004.

GEMMELL,C.G., Staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Med. Microbiol*, 43, 318-327, 1995.

GOERKE, C ; PANTUCEK ; HOLTEFRETER, S.; SCHULTE, B. et al., Diversity of prophages in dominant *S. aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.*, v.191, p.3462-3468,2009.

GOERKE, C ; WIRTZ, C.; FLUKIGER ,U.; WOLZ, C .Extensive phage dynamics in *S. aureus* contributes to adaptation to the human host during infection . *Mol. Microbiol.* 2006, 61, 1673-1685.

HAMILL, R.J.; VANN, J.M.; PROCTOR, RA.; Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for posthaqderence events in endovascular infections. *Infectious and Immunology*, v. 54, p. 833-836, 1986.

HARRIS, T.O.; GROSSMAN, D.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P.; RICH, R.R.; BETLEY, M.J. Lack complete correlation between T- cell- stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infection and Immunology*, v. 61, p. 3175-3183, 1993.

HARRISON et al. *Medicina Interna*. Ed. Rio de Janeiro, 2002.

HARRISON. *Doenças Infecciosas*. AMGH Editora Ltda. 2ª Edição, 2015.

HEUMMANN, D.; BARRAS, C.; SEVERIN, A.; GLAUSER, M.P.; TOMASZ, A.; Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin- 6 by human monocytes. *Infectious and Immunology*, v.63, p. 2715-2721, 1994.

HIDRON, A.I. et al. NHSN annual update : antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Cont. Hosp. Epidemiol.*, Chicago, v.29, n.11, p.996-1011, 2008.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, FC. Methicillin-resistan *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobials and Chemoterapycs*, v. 40, p. 135-136, 1997. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. *MMWR Mob. Mortal Wkly Report*, v. 46, p. 626-628, 635, 1997.

HIRAMATSU,K. et al . Methiciin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobials and Chemoterapycs*, v.40, p.135-136, 1997.

HOWDEN,B.P. et al. Reduced vancomycin Susceptibility in *S. aureus* ,including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin –intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin.Microbiol.Rev.*, Washington,v.23, n.1, p.99-139, jan.2010.

JERNIGAN, J.A.; FARR, B.M. Short-course therapy of catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a Meta – analysis. *Annals International of Medicin*, v. 119, p. 304-311, 1993.

KALLINGS LO, The susceptibility of staphylococcal hospital strains to methyl-phenyl-esoxazolyl penicillin . Acta of Tathology Microbiology and Immunology Scandinavia, v. 54, p.127-128, 1962.

KESSLER, C. M.; NUSSBAUM, E.; TUAZON,C.U. Disseminated intravascular coagulation associated with Staphylococcus aureus septicemia is mediated by peptideoglycan-induced platelet aggregation. Journal of Infectious Disease,v.164, p.101-107, 1991.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120, 1980.

KLOOS, W.E. e LAMBRE JR, D.W. Staphylococcus. Manual of clinical microbiology. 5a. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 222-227, 1991.

KLOOS, W.E. e SCHEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species. J Clin Microbiol, v.1, p. 82-88, 1975.

KIUYTMANS, J.A.J.W.; MOUTON, .W.; IJZERMAN, E.P.F. Nasal carriage of Staphylococcus aureus as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. Journal of Infectious Disease, v.171, p. 216-219, 1995.

KOLLY, M.H. Antibiotic management of ventilator associated pneumonia due to antibiotic-resistant gram-positive bacterial infection. J. Clin. Microbial Infect. Dis, v. 24, n. 12, p. 794-803, 2005.

LABANDEIRA-REY M, COUZON F, BOISSET S, BROWN EL, BES M, BENIRTO Y, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leucocidin causes necrotizing pneumonia.v.315 (5815): p.1130-3, 2007

LADHANI, S. and JOANNOU, C.L. Difficulties in The diagnosis and management of staphylococcal scalded skin syndrome. Pediatric Infect. Dis, v.3, n. 142, p. 1251-1255, 2000.

LADHANI, S. Recent developments in staphylococcal scalded-kin syndrome. Clin. Microbiol. Infect, v. 12, p. 301-307, 2001.

- LADHANI, S. Understanding the mechanism of action of the exfoliate toxins of *S. aureus*. *Immunology and Medical Microbiology*, v.30, p. 181-189, 2003.
- LANE, W.R. Methicilin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Medical Journal of Austria*, v.49, p. 962-965, 1962.
- LARCOMBE L. et al. Rapid emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. (MRSA) among children and adolescents in northern Manitoba, 2003-2006. *Can Commun Dis Rep*,v. 33,n.2 ,p.9-14, 2007.
- LASH P. et al. Insufficient discriminatory power of Maldi-Tof mass spectrometry for Typing of *Enterococcus farcims* and *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Microbiological Methods* ,v. 100, p.58-69,2014.
- LE LOIS Y, BARON FG, GAUTIER M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* .v.2 (1): p.63-76, 2003.
- LEE, J.C. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus* . *Trends of Microbiology*,v.4,p.162-166, 1996.
- LIMA,D.C. et al. Snake venom: any clue for antibiotic sand cam? *Evid Based Complement Alternat Med*, v.2, n.1,p.39-47, 2005.
- LOCKSLEY, R.M.; COHEN, M.L.; QUINN, T.C. Multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann Intern Med*. v.97, p. 317-324, 1982.
- LOPES HV . CA-MRSA : um novo problema para o infectologista. *Rev Panam Infectol*, v.7, n.3, p.34-6, 2005.
- LOWY, F. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, v.339, n.8, p.520-532, 1998.
- MAC GOWAN, Jr. J.E., TERRY, P.M., HUANG, T.S.R. Nosocomial infections with gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*: plasmid analysis as an epidemiologic tool. *J. Infect Dis*, v. 140, p. 864-972, 1979.

MALACHOWA N, SABAT A, GNIADKPWSKI M, KRZYSZTON-RUSSJAN J, EMPEL J, MIEDZOBRODZKI J, KOSOWSKA-SHICK K, APPELBAUM PC, HRYNIEWICZ W. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *S. aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 43: p. 3095-3100, 2005.

MARRACK P, KAPPLER J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; v.248: p.705-711, 1990.

MOREIRA, M.R. et al. Risk factors and evolution of Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus* sensitive or resistant to Oxacilin in patients at Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital. *Braz J Infect Dis.* V.30, p. 179-208, 2008.

MULLIGAN, M.E. e ARBEIT, R.D. Epidemiologic and clinical utility of typing system for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infect. *Control Hosp Epidemiology*, v. 12, p. 20-28, 1991.

MURRAY. *Microbiologia Médica 4*. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

MUSHER DM, LAMM N, DARONICHE RO, YOUNG EJ, HAMIL RJ, LANDON GC. The current spectrum of *S. aureus* infection in a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)* 1994; 73: 186-208.

NABER CK. *Staphylococcus aureus* Bacteremia : Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*. v.48 (Suppl 4) : 231-7, 2009.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Document: M2-A8, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard – Eighth edition ,2003.

NEMOY LL, KOTETISHVILI M, TIGNO J, KEEFER-NORRIS A, HARRIS AD, PERENCEVICH EN, JOHNSON JA, TORPEY D, SULAKVELIDZE A, MORRIS JG, Jr, STINE OC. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 43: p. 1776-1781, 2005.

NEWSOM SW. Ogston's Coccus. J. Hosp Infect. 2008; 70: 369-72, 2008.

NOBLE, W.C.; VIRANI, Z. Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett, v.93, p.195-8, 1992.

NOVICK, R.P. The staphylococcus as a molecular genetic system. In: Novick, R.P., ed. Molecular biology of the staphylococcus. New York: VHC, p.1-37, 1990.

O'BRIEN FG, PEARMAN JW, GRACEY M, RILEY TV, GRUBB WB. Community strain of methicillin-resistant *S. aureus* involved a hospital outbreak. J. Clin. Microbiol. v. 37: p.2858-2862, 1999.

OGSTON, A. Micrococcus poisoning. J. Anat. ;17, p.24-58, 1882.

OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I.; SÁ, M.E.P. Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana in vitro frente a amostras de *Staphylococcus sp* isolados de mastite subclínica bovina, no Agreste meridional de Pernambuco. Hora Veterinária, v.22, n.127, p.857-862, 2002.

OLIVEIRA, C.F. et al. The emergency of antimicrobial-resistant *S. aureus*: a continuing challenge. Rev. Ciênc. Méd. Biol., Salvador, v.13, n.2, p.242-247, mai./ago.2014.

OLIVEIRA, G.A. et al. Características laboratoriais de *Staphylococcus aureus* isolado de paciente que não respondeu ao tratamento com vancomicina. Infectious Control and Hosp Epidemiology, v.20, p.230-234, 2000.

OMS, ANTIMICROBIAL RESISTANCE GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE, 2014. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014.

PANLILIO, A.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in USA hospitals, 1975-1991. Infectious Control Hospital Epidemiology. V.13, p.582-586, 1992.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MCGAVIN, M.J.; HOOK, M. MSCRAMM - mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annals Reviews of Microbiology, v. 48, p. 585-617, 1994.

PÉREZ-ROTH E, LORENZO-DIAZ F, BATISTA N, MORENO A, MÉNDEZ-ALVAREZ S. 2004 Tracking methicilin-resistant *S. aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* v.42: p.4649-4656, 2004.

PFALLER, M.A. Molecular epidemiology typing of nosocomial pathogens. *Clin Microbiol updates* v. 4, p. 1-7, 1992.

PFALLER, M.A. Typing methods for epidemiologic investigation. In: Ballows A. Haussler Jr W. Herrmann, K.L. et al. *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, 5th ed. Washington, D.C., 1991.

PROCTOR, R.A.; VAN LANGEVELDE, P.; KRISTJANSON, M.; MASLOW, J.N.; ARBEIT, R.D. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinics Infectious Disease*, v.20, p. 95-102, 1995.

RAAD, I.I.; SABBAGH, M.E. Optimal duration of therapy of catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a study of 55 cases and review. *Clinical Infectious Disease*, v. 14, p. 75-82, 1992.

REYNOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 8, p. 943-950, 1989

Microbiology, v.4, p.162-166, 1996.

RODRIGUEZ-NORIEGA E, SEAS C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America : Implications for clinical practice in the region. *Brazilian Journal Infect Disease*, v.14 (Suppl 2); p.87-96, 2010.

ROSSI, F. e ANDREAZZI, D.B. *Resistência Bacteriana- Interpretando o antibiograma*. ed.Sao Paulo : Atheneu, 2005.

ROTUN, S.S. et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated a patient with fatal bacteremia. *Emerg Infectious Disease* , v.5, n.1, 1999.

RODRIGUEZ-NORIEGA E, SEAS C, GUZMAN-BLANCO M et al. Evolution of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *J.Infect Dis.* v.14 , p. 560-6, 2010.

SABAT, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, and J. Potempa.. New method for typing **Staphylococcus aureus** strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. v.41: p.1801-1804, 2003.

SADER, H.A.; PIGNATARI, A.C.; HOLLIS, R.J. Oxacilin and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. Infect Control Hosp Epidemiol, v. 14, p. 260-264, 1993.

SAMBROOK J., Fritschi EF and Maniatis T Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANDRE, R.M.; SHAFRAN, S.D. Infective endocardites: review of 135 cases over 9 years. Clinical Infectious Disease, v.22, p. 276-286, 1996.

SANGER et al., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biochemistry. v.74, n.12, p-5463-5467, 1977.

SANTOS AL.; SANTOS DO et al. Staphylococcus aureus visitando uma cepa de importância hospitalar . J. Bras. Pat. Med. Lab. v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SATO, H.; MATSUMORI, Y.; TANABE, T.; SAITO, H.; SHIMIZU, A.; AKIRA, A. and KAWANO, J. A new type of staphylococcal exfoliate toxin isolated from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegm on. Infect. Immun, v. 62, n.3, p. 3780-3785, 1994.

SCHLICHTING, C.; BRANGER, C.; FOURNIER, J.M. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoreses, zymotyping, capsular typing and phage typing : resolution of clonal relationships. J. Clin Microbiol, v. 31, p. 227-232, 1993.

SENGUPTA DJ, CUMMINGS LA, HOOGESTRAATE DR, BUTLER-WU SM, SHENDURE J, COOKSON BT, SALIPANTE SJ. Whole-Genome Sequencing for High-Resolution Investigation of Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and Genome Plasticity. Journal of Clinical Microbiology, v. 52 n. 8 P. 2787-2796, 2014.

SHEN K. et al. Extensive Genomic Plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* Revealed by Identification and Distribution Studies of Novel genes among Clinical Isolates *Infection and Immunity*, v.74, n.9 , p.5272-5283, sept.2006.

SHINEFIELD, H.; BLACK, S.; FATTOM, A; HORWITH, G. Use of *S. aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis, *N. Engl. J. Med*, v.346, n.7 , p.491-495, 2002.

SHORE,A.C. ET AL .Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome , mec R1 type XI carrying highly divergent mec A, mec I, blaZ, and ccr genes in human clinical of clonal complex isolates 130 methicilin-resistant *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, Washington, v.55, n.8, p.3765-3773, aug.2011.

SOLOAGA, R. et al . Detection de metilino-resistencia em *S. aureus*. Comparation de métodos convencionales y aglutinacion com MRSA Screen látex. *Rev. Agent. Microbiol.* v.36, n.1, 2004.

SOYER, R.; BESSOU, J.P.; BOUCHART, F. Surgical treatment of infected composite graft after replacement of ascending aorta. *Ann Thoracic Surg*, v. 58, p. 425-428, 1994.

STEGGER M, ANDERSEN PS, KEARNS A ,PICHON B,HOLMES MA,EDWARDS G, LAURENT F, TEALE C, SKOV R, LARSEN AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mec A or the new mec A homologue mec A (LGA 251). *Clin Microbiol Infect.* 2012 Apr; 18 (4) : 395-400.

STYRS D, et al. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*:2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* . v.5, p 2, 2006.

TAMURA K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. . MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*,v.30: p. 2725-2729, 2013.

TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Soc. de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p.281-301, 2004.

THOMPSON, R.L.; CABEZUDO, I. & WENZEL, R.P. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *An Intern Med* v. 97, p. 309-317, 1984.

TIMMERMAN, C.P.; MATTSON, E.; MARTINEZ- MARTINEZ, L. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infectious and*

TRABULSI; ALTHERHUM. *Microbiologia* 4 Ed.São Paulo: Atheneu,2004.

TRINDADE PA, PACHECO RL, COSTA SF, ROSSI F, BARONE AA, MAMIZUKA EM et al. Prevalence of SCCmec Type IV in nosocomial Bloodstream Isolates of Methicillin-Resistant *S. aureus*. *J. Clin. Microbiol.* v.43 (7) : p.3435-7, 2005.

TROIDLE L, EISEN T, PACELLI L, FINKRLSTEIN E, Complications associated with the development of bacteremia with *S. aureus*. *Hemodial Int* 2007; v.11 :p. 72-5, 2007.

UTSUI, Y.; YAKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephen-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobials Agents and Chemotherapies*, v. 28, p. 397-403, 1985.

VELASQUEZ-MEZA,M.E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination *Salud Pública de México*, v.47, p. 381-7, 2005.

VERCELLOTTI, G.M.; LUSSENHOP, D.; PETERSON, P.K. Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism. *Journal of Laboratory of Clinical Medical*, v. 103, p. 34-43, 1984.

VERDRENGH, M.; TARKOVSKI, A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infectious and Immunology*. v.65, p. 2517-2521, 1997.

VON EIFF,C.; BECHER, K.; MACHKA,K. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *The New England Journal of Medicin* . v. 344, p.11-16, 2001.

VON RITTERSHAIN, G.R. Die Exfolitive Dermatitis Jungener Seuglinge. *Z. Kinderheilkd*, v. 2, p. 3-23,1878.

WATTAM, A.R., D. Abraham, O. Dalay, T.L. Disz, T. Driscoll, J.L. Gabbard, J.J. Gillespie, R. Gough, D. Hix, R. Kenyon, D. Machi, C. Mao, E.K. Nordberg, R. Olson, R. Overbeek, G.D. Pusch, M. Shukla, J. Schulman, R.L. Stevens, D.E. Sullivan, V. Vonstein, A. Warren, R. Will, M.J.C. Wilson, H. Seung Yoo, C. Zhang, Y. Zhang, B.W. Sobral (2014). "PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource." Nucl Acids Res 42 (D1): D581-D591. doi:10.1093/nar/gkt1099

WENZEL, R.P. ; PERL,T.M. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection . Journal of Hospital Infection ,v.31,p.13-24,1995.

WERGELAND, H.I.; HAAHEIM, L.R. Antibodies to staphylococcal peptidoglycan and its peptide epitopes, teichoic acid in sera from blood donors and patients with staphylococcal infections. Journal of Clinical Microbiology, v. 27, p. 1286-1291, 1991.

WILKINSON, B. J. The staphylococci in human disease. Biology,v.1, p.38, 1997.

WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT SM, SEIFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis, v.39: p.309-317, 2004.

WISPLINGHOFF H, ROSATO AE, ENRIGHT MC, NOTO M, CRAIG W, ARCHER GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. Antimicrob Agents Chemother.v. 47: p.3574–3579, 2003.

YAMAGUCHI, T.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, M.; FUDABA, Y.; AEPFELBACHER, M.; TAKATA, T.; OHARA, M.; KOMATSUZAWA, H.; AMAGAI, M.and SUGAI, M. Identification of the *S. aureus* end pathogenicity, island which encodes a novel exfoliate toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun., v. 70, p. 5835-5845, 2002.

YAO, L.; BERMAN, J W.; FACTOR, S.M.; LOWY, F.D. Correlation of histopathology and bacteriologic changes with cytokine expression in an experimental murine model of bacteremic *Staphylococcus aureus* infection. Infection and Immunology, v. 65, p. 3889-3895, 1997.

YOSHIDA RP et al., Physiological and molecular analyses of a mec A-negative *S. aureus* clinical strain that express heterogeneous methicillin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, Oxford, v.51,n.2, p.247-255, 2005.

YZERMAN, E.P.F.; BOELENS, H.A.M.; TJHIE, J.H.T. Apache for predicting course and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia and its relation to host defense. *Journal of Infection Disease*, v. 173, p. 914-919, 1996.

ZIEBANDT AK, KUSCH H, DEGNER M, JAGLITZ S, SIBBALD MJJB, ARENDS JP, CHLEBOWICZ MA, ALBRECHT D, PANTUCECK R, DOSKAR J, ZIEBUHR W, BROKER BM, HECKER M, VAN DIJL JM, ENGELMAN S. *Proteomics*.v.10,p.1634-1644, 2010.

8. ANEXOS

8.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

UFAM

Doutorado em Biotecologia

TERMO DE CONSENTIMENTO

Investigador: Maria Auxiliadora Neves de Carvalho.

Instituições: Universidade Federal do Amazonas.

Título: Caracterização Epidemiológica e Molecular do *Staphylococcus aureus* em Manaus – Amazonas .

Justificativa e objetivos do estudo

O presente estudo tem como objetivo avaliar os pacientes com culturas positivas para *S.aureus*, levando em consideração os aspectos epidemiológicos, clínicos , laboratoriais (antibiograma dos germes isolados e leucograma) e genômicos.

O paciente receberá a explicação de que estará como voluntário (a) nesta investigação e que será uma das pessoas que deverá, também, participar do estudo e lhe será assegurado o direito de abandonar esta pesquisa a qualquer momento, se assim desejar.

Ao concordar em participar do estudo, o (a) paciente permitirá que seja questionado sobre seus dados pessoais, saúde e hábitos de vida.

Desconforto Associado ao Estudo

Não haverá nenhum, pois o mesmo responderá somente a um formulário, que não representa nenhum risco a saúde.

Benefícios

Participando deste estudo, o voluntário poderá se beneficiar e os resultados da pesquisa em caso de necessidade de tratamento prolongado, mas estará contribuindo para uma avaliação do comportamento do *S.aureus* em pacientes contaminados com essa bactéria em nossa região de clima tropical, assim como propiciará que com esse estudo outras pessoas sejam poupadas dos malefícios causados por esse germe, e também tornarão possível o descobrimento de melhores estratégias de neutralização após seu isolamento e identificação.

Confidencialidade e avaliação dos registros

A participação do voluntário neste trabalho será confidencial, os registros ou resultados do estudo serão mostrados na Universidade do Amazonas bem como as autoridades normativas ou internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisa clínica ou para fins normativos. A identidade do paciente permanecerá sempre em confidencialidade.

Direito a retirada do estudo

O voluntário terá direito de fazer qualquer pergunta referente à sua participação nesse estudo e será notificado sob qualquer nova informação relacionada a este estudo será capaz de contatar a Dra. Maria Auxiliadora Neves de Carvalho. O número do telefone para contato é 232-348783.

Terá o direito de retirar sua participação nesse estudo a qualquer momento, se assim o desejar.

Participação Voluntária

A participação é voluntária. Caso não participe deste estudo, não haverá qualquer perda de benefícios a que tenha direito (por exemplo, informações sobre o trabalho que está sendo realizado).

Consentimento pós-informação

E, por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo desse termo, livremente expresso meu consentimento para minha inclusão, como sujeito nesse estudo.

_____ Data _____

Participante

_____ Data _____

Responsável pelo estudo.

Manaus, ____ de _____ 200.

8.2 QUESTIONÁRIO

UFAM-UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PESQUISA SOBRE CARACTERES CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E

LABORATORIAIS DAS ESTAFILOCOCCIAS CAUSADAS PELO *S. AUREUS* MANAUS-AM.

Questionário de aplicação direta, à paciente de qualquer faixa etária, que apresente cultura positiva para *S. aureus*.

Definição do caso: paciente de qualquer faixa etária, sexo, raça, que apresente cultura positiva para *S. aureus*.

1 - Nome: _____

2- Hospital: _____

3 - Registro Hospitalar N° _____

4- N° da amostra no laboratório: _____

5- Sexo. _____ 6- Raça: _____ 7- Idade: _____ 8- Data do nascimento: _____

9- Endereço:

Rua: _____ Bairro: _____ 10-

Zona: _____ 11- Há quanto tempo está no endereço: _____

12- Telefone: _____

13- Óbito: Sim () Não ()

14- Peso: _____ 15- Altura: _____

16- Renda Familiar: _____

17- Grau de Instrução: _____

18- Na casa qual a origem da água de beber poço () encanada: () engarrafada: ()

Rio () Ferve: Sim () Não () Adiciona Hipoclorito: ()

19- Qual o tipo de sanitário existente na casa? O Banheiro com sanitário dentro de casa()
Sanitário tipo casinha ()

20- Quantas pessoas moram na casa. 21- Quantos quartos há na casa: _____

22- Está internado: Sim () Não ()

23- Qual hospital? _____

24- Data da internação _____ 25- Data da alta: _____

26- Procurou tratamento antes da internação: Sim () Não ()

27- Aonde? _____

28- Que antibióticos fez uso _____

29- Tipo de Estafilococcia (doença): _____

30- Porta de Entrada:

31- Leucograma:

32- Antibiograma:

Amox/Clav () Apicilina () Cefazolina () Cloranfenicol () Ciprofloxacina ()

Cindamicina () Erítromicina () Gentamicina () Imipenem () Levofloxacina ()

Linezolid () Nitrofttrantoína () Oxacilina () Penicilina () Rifampicina () Synercid () Tetracilina ()

Trimeth/Sulfa () Vancomicina () Pip-Tazo ()

33- Tratamento: _____

34- Quadro clínico: Febre: Sim () Não () Até quanto tempo após início do tto. _____

Cefaléia: Sim () Não ()

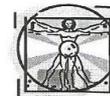
Anorexia: Sim () Não ()

Dor: Sim () Não () Aonde: _____

35- Tem outras doenças: _____

36- Desnutrido () Eutrófico () Obeso ()

8.3. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PODER EXECUTIVO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 0217.0.115.000-10, intitulado: “**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS NO ESTADO DO AMAZONAS**”, tendo como Pesquisadora Responsável Maria Auxiliadora Neves de Carvalho.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 11 de agosto de 2011.


Profª. Dra. Ana Paula Pessoa de Oliveira
Coordenador CEP/UFAM

8.4. TABELA DE IDADES

Distribuição da População por Faixa etária com cultura positiva para o *S. aureus* para os grupos A e B.

FAIXA ETÁRIA (em anos)	FREQUÊNCIA	%
Grupo A		
0 a 13	8	14,5
14 a 20	2	3,6
21 a 35	15	27,3
36 a 45	3	5,5
46 a 65	12	21,8
> 65	15	27,3
Total	55	100,0
Grupo B		
0 a 13	9	15,5
14 a 20	9	15,5
21 a 35	12	20,7
36 a 45	13	22,4
46 a 65	7	12,1
> 65	8	13,8
TOTAL	58	100,0

8.5. MANUSCRITO I

8.6. MANUSCRITO 2