

LUIZA LESSA ANDRADE

**PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*
EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS COM E
SEM CONTATO COM O AMBIENTE
HOSPITALAR**



Dissertação apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), visando a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* EM ESTUDANTES
UNIVERSITÁRIOS COM E SEM CONTATO COM O AMBIENTE HOSPITALAR

Luiza Lessa Andrade

Orientadora: Angela Christina Dias de Castro

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovada por:

Presidente, Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Prof^a. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Prof^a. Vânia Lúcia Carreira Merquior

Prof^a. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

ANDRADE, Luiza Lessa

Prevalência de *Staphylococcus aureus* em estudantes universitários com e sem contato com o ambiente hospitalar. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, 2008.

xvi, 82 p.

Dissertação: Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)

- 1- *Staphylococcus aureus*
- 2- Colonização
- 3- Estudantes universitários
- 4- Susceptibilidade a antibióticos
- 5- Diversidade genética

- I. Universidade Federal do Rio de Janeiro
- II. Título

Trabalho realizado no Laboratório de Patogênese e Resistência de Cocos Gram-Positivos do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof^a Angela Christina Dias de Castro.

**Aos meus amados pais,
Sandra e Aloízio.
Aos meus queridos irmãos,
Sandro e Philipp.**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Sandra**, meu porto seguro. Obrigada por tanto amor, respeito, paciência, dedicação e incentivo. E, é claro, pela força extra nos meus momentos de insegurança. Eu te amo.

Ao meu pai, **Aloízio**, que lutou desde cedo para vencer. Muito obrigada por ter dedicado a sua vida, ao lado da mamãe, pelo meu conforto e bem-estar, mesmo quando isso significou abdicar de alguns sonhos.

Aos meus irmãos, **Sandro** e **Philipp**, com quem eu tive que aprender a dividir, e por três!!!! Obrigada por acreditarem e torcerem sempre por mim. *Seja agradável com seus irmãos. Eles são o seu melhor vínculo com o passado e aqueles, que no futuro, provavelmente nunca deixarão você na mão* (Baz Lurhmann). Entenderam, né? Comportem-se bem comigo!

À minha querida avó **Conceição** (*in memoriam*). *Você foi embora/ Deixou vazia a casa/ O riso num álbum de fotografias/ E aquela imagem de Santa Rita.../ E eu fiquei lá fora/ Brincando de cidade deserta/ Chupando manga/ Pedindo um beijo.../ E agora é a velha história/ Você virou saudade/ Daqueles tempos da carochinha/ Daquela vida que eu inventei/ Daquela reza que eu decorei/ Agora eu vou vivendo/ No mundo sem sonho ou lenda/ E só de noite quando eu me lembro/ Eu sinto um troço no meu peito/ E durmo.../ Seu neto* (Cazuza)

Aos meus padrinhos, **Fátima** e **Pacheco**. Ao meu primo **Carlinhos**. Aos meus tios **Raimundão**, **Vicentão** e **Paulão**. À **Ana Cláudia**. Obrigada pela torcida enorme, pelo apoio em todas as horas, pela energia boa que me transmitem e pela alegria que me proporcionam sempre que estamos juntos.

Ao **Nando**, meu namorado e amigo, por todo carinho, paciência e por nunca permitir que eu duvide de mim. Obrigada por me servir de exemplo de que tudo está ao nosso alcance quando temos determinação. *Dos teus olhos sai alguma coisa de muito doce que me faz um bem imenso* (Gustave Flaubert).

À **Profª Angela**, por ter me recebido em seu laboratório, na Iniciação Científica, e pela orientação ao longo desses anos. Além disso, obrigada pelo apoio e confiança, pela amizade e pelo carinho e por todo incentivo para a realização deste trabalho.

À minha "irmã", **Rachel**, um dos melhores presentes que a UFRJ me deu. Um exemplo pra mim. Muito obrigada por toda atenção, carinho, paciência, pelos conselhos, pelas decisões, e pela festa que sempre é estar com você.

Aos meus amigos queridos, **Roberta, Thais, Rodrigo, Max, Gabi, Alec, Agatha, Jajá, Marina e Débora**. Em especial, à **Suzy**, que me ajudou em certa etapa da pesquisa, e à **Crissi**, que vivenciou comigo a construção deste trabalho. Obrigada a todos pela amizade valiosa, por tantos momentos alegres e engraçados, e pelas palavras animadoras em dias menos felizes.

Aos amigos da Microbiologia Médica, **Otávio, Leo, Cícera, Profª Lenise, Aninha, Jaque, Jack, Filó, Giseli, Felipe, Felipe Cabelo, Camille, Prof. Rafael Duarte, Profª Cláudia** (agora na UFF), **Lúcio, Jéssica, Karla, Ivi, Manu, Profª Marinella, Elaine, Joaquim, Orlando, Antônio, Raquel, Dona Ana, Prof. Marcão e Profª Regina** (minha protetora). Muito obrigada por momentos tão agradáveis, descontraídos ou sérios, pelas conversas, pela força que sempre me deram, e pela ajuda em tantos momentos.

Aos amigos do laboratório 28, **Endomyrnax, Julian, Talita, Flávia, Rosana Bin Laden, Lívia, Ângelo, Natacha, Carolina, Ana Paula e SuperVal**, pelos (muito bem definidos) momentos de descontração, *porque excessivamente grave é a Vida* (Vinícius de Moraes).

À **Semíramis**, minha mamã, uma grande amiga! Obrigada pela ajuda fundamental no laboratório e pelo carinho que tem por mim.

Ao **Sr. Luiz**. Obrigada pela boa convivência e pela grande ajuda no laboratório.

Às amigas que fiz no laboratório, **Luisa, Eline, Viviane** e, em especial, **Renata**, pela paciência, ajuda e ensinamentos.

À **Dilma**, pela atenção na biblioteca, e à **Shirlei**, na secretaria.

À coordenação da **Escola de Enfermagem Ana Nery**, da UFRJ, nas pessoas dos professores **Paulo e Conceição** (*in memoriam*).

Às **Profª Bia e Bernadete**, e ao **Prof. Sérgio**, pelo incentivo, conselhos e amizade.

Ao **IMPPG**, na pessoa da **Profª Agnes Figueiredo**.

Ao **CNPq**, à **FAPERJ, FOGARTY** (Berkeley, EUA), e ao **PRONEX**, pelo apoio financeiro.

*"Abelha fazendo o mel
vale o tempo que não voou"*

Beto Guedes

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL – microlitro

A – adenina

AIDS – “acquired immunodeficiency syndrome”

ATCC – “American Type Culture Collection”

attBSCC – sítio próximo à origem de replicação em *Staphylococcus aureus*

C - citosina

°C – graus Celsius

Ca⁺² – cálcio

CA-MRSA – “community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

cm – centímetros

ccr- gene que codifica recombinases responsáveis pela excisão e inserção do material genético no cromossoma

dATP – didesoxi adenosina trifosfato

dCTP – didesoxi citosina trifosfato

dGTP – didesoxi guanosina trifosfato

dTTP – didesoxi timidina trifosfato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – densidade óptica

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Fc – fração cristalizadora das imunoglobulinas

g – gravidade

G – guanina

HA-MRSA – “hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

HCl – ácido clorídrico

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IgG – imunoglobulina G

IS – “insertion sequence”

J – região do cassete cromossômico estafilocócico *mec*

KCl – cloreto de potássio

lukS-PV-lukF-PV – genes que codificam a leucocidina Panton-Valetine

M – molar

mecA – gene que codifica a resistência à meticilina/oxacilina

mecI – gene regulatório da resistência à meticilina

MecI – proteína que reprime a transcrição de *mecA*

mecR1 – gene regulatório da resistência à meticilina

MecR1 – proteína de membrana com afinidade por β-lactâmicos

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – miligrama

MLS_B – macrolídeos, lincosamídeos e estreptograminas B

MLST – “multilocus sequence typing”

mm – milímetros

mM – milimolar

MRSA – “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

MSCRAMM – “microbial surface components recognizing adhesive matrix”

MSSA – “methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*”

NaCl – cloreto de sódio

NCCLS – “National Committee for Clinical Laboratory Standards”

nM – nanomolar

NTED – “neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease”

pb – pares de bases

PBP – “penicillin-binding protein”
PCR – “polimerase chain reaction”
PFGE – “pulsed-field gel electrophoresis”
pH – potencial de hidrogênio
PIV – um dos tampões utilizados na PFGE
PVL – leucocidina Panton-Valentine
rRNA – ácido ribonucléico ribossômico
SCC*mec* – “staphylococcal cassette chromosome *mec*”
SFD – “staphylococcal foodborne disease”
*Sma*I – enzima de restrição
SSSS – “staphylococcal scalded skin syndrome”
T – timina
TBE – Tris-borato-EDTA
TE – Tris-EDTA
tra – região do genoma de algumas bactérias responsável pela transferência conjugativa de material genético
TSA – “tryptcase soy agar”
TSS – “toxic shock syndrome”
U – unidades
UPGMA – “Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages”
V – volts

**PREVALÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* EM ESTUDANTES
UNIVERSITÁRIOS COM E SEM CONTATO COM O AMBIENTE
HOSPITALAR**

Luiza Lessa Andrade

Orientadora: Angela Christina Dias de Castro

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) não é mais um problema restrito ao meio hospitalar. MRSA emergiu na comunidade como um importante patógeno de seres humanos. Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos observados nestas amostras sugerem uma possível origem comunitária. Com a biologia molecular foi possível detectar o gene de resistência à meticilina em *S. aureus* (*mecA*) e classificar seis diferentes alotipos encontrados nas amostras: SCC*mec* do tipo I ao VI. O quarto tipo foi descrito, inicialmente, entre amostras comunitárias e, posteriormente, entre amostras hospitalares. No Brasil, são necessários mais estudos sobre a colonização por *S. aureus*. O presente estudo teve como objetivos estabelecer a prevalência de *S. aureus* entre estudantes universitários com e sem contato acadêmico com hospitais e verificar a existência de fatores de risco para a colonização. Além disso, as amostras foram caracterizadas de acordo com o perfil de susceptibilidade a antibióticos; presença do gene *mecA* e classificação do SCC*mec*; presença dos genes da leucocidina Pantón-Valentine (PVL) e relação epidemiológica existente, através da metodologia de eletroforese em gel de campo pulsado.

Foram coletados 301 “swabs” nasais de estudantes de enfermagem entre junho de 2005 e novembro de 2006. Duzentos e um estudantes não tiveram contato acadêmico com hospitais enquanto que 100 tiveram contato. Destes, 118 estudantes (39,2%) estavam colonizados por *S. aureus*: 85 (42,3%) sem contato e 33 (33%) com contato com o ambiente hospitalar.

As amostras bacterianas apresentaram-se sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados. Quatro indivíduos (3,4%) foram identificados como carreadores nasais de MRSA. Apenas um deles havia tido contato com hospitais. Os perfis de susceptibilidade a outros antimicrobianos foram característicos de CA-MRSA. Todas as amostras MRSA apresentaram o gene *mecA* e SCC*mec* IVa, mas nenhuma apresentou os genes para PVL. Foi observada grande diversidade genética entre as 118 amostras. Nenhuma das variáveis avaliadas mostrou ser fator de risco para a colonização por *S. aureus*.

PREVALENCE OF *Staphylococcus aureus* BETWEEN UNIVERSITY STUDENTS IN CONTACT OR NOT WITH HOSPITAL ENVIRONMENT

Luiza Lessa Andrade

Orientadora: Angela Christina Dias de Castro

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) can no longer be regarded as a purely nosocomial problem. Community-associated MRSA (CA-MRSA) has emerged as an important human pathogen. Antimicrobial susceptibility profiles of these community-onset isolates suggest their possible non-hospital origin. The use of molecular methods has allowed detecting methicillin resistance gene (*mecA*) and has also revealed six different allotypes that are designated SCC*mec* types I-VI. The fourth type has been described, first in CA-MRSA isolates and then in several MRSA backgrounds, including hospital isolates. More researches on *S. aureus* nasal carriage are necessary in Brazil. Hence, the aim of this study was to determine the prevalence of *S. aureus* between university students in contact or not with hospital environment and to determine risk factors for *S. aureus* colonization. We also sought to characterize the isolates with regard to the antibiotic susceptibility patterns; presence of *mecA* gene and SCC*mec* type; presence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) genes; and epidemiologic relatedness by pulsed field gel electrophoresis.

Nasal swabs were collected from 301 Nursing students between June 2005 to November 2006. Two-hundred one individuals had no academic contact with hospital environment, whereas 100 had this experience. There were 118 students (39.2%) colonized with *S. aureus*: 85 (42.3%) without contact and 33 (33%) in contact.

Antibiotic susceptibility testing revealed that the isolates were susceptible to the majority of tested drugs. Four individuals (3.4%) had their nares cultures positive for MRSA. Only one of them had academic contact with hospital environment. Antimicrobial susceptibility patterns were similar to CA-MRSA strains. All these MRSA isolates harboured *mecA* gene and SCC*mec* IVa, but were negative for PVL genes. The 118 isolates presented very diverse genetic backgrounds. The analyzed variables were not risk factors for *S. aureus* colonization.

Introdução

I. Características gerais.....	1
II. Patogênese.....	2
III. Fatores de risco para infecções por <i>S. aureus</i>	3
IV. Diversidade genética.....	7
V. Fatores de Virulência.....	8
VI. Tratamento de resistência a drogas.....	12

Objetivos.....	20
-----------------------	-----------

Material e Métodos

I. Desenho do estudo.....	21
II. Coleta do espécime clínico.....	21
III. Isolamento e identificação bacteriana.....	22
IV. Susceptibilidade aos antimicrobianos	
IV. 1. Teste de difusão em ágar.....	22
IV. 2. Teste de triagem para resistência à oxacilina.....	23
V. Detecção do gene de resistência à meticilina (<i>mecA</i>) e caracterização do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (<i>SCCmec</i>)	
V. 1. Extração de DNA.....	24
V. 2. Amplificação do gene <i>mecA</i> e tipagem do <i>SCCmec</i>	25
VI. Detecção dos genes para leucocidina Panton-Valentine (<i>lukS- PV-lukF-PV</i>)	
VI. 1. Extração de DNA.....	27
VI. 2. Amplificação dos genes <i>lukS-PV-lukF-PV</i>	27
VII. Análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico.....	28

VIII. Análise estatística.....	30
IX. Recursos.....	30
X. Aspectos éticos.....	31

Resultados

I. Espécimes clínicos.....	32
II. Isolamento de <i>S. aureus</i>	32
III. Utilização das amostras na pesquisa.....	33
IV. Susceptibilidade aos antimicrobianos	
IV. 1. Teste de difusão em ágar.....	34
IV. 2. Teste de triagem para resistência à oxacilina.....	36
V. Detecção do gene de resistência à meticilina (<i>mecA</i>) e caracterização do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (<i>SCCmec</i>).....	37
VI. Detecção dos genes para leucocidina Panton-Valentine (<i>lukS-PV-lukF-PV</i>).....	37
VII. Análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico.....	37
Tabela 1.....	39
Tabela 2.....	40
Tabela 3.....	41
Figura 1.....	42
Figura 2.....	42
Figura 3.....	42
Figura 4.....	43
Figura 5.....	43
Figura 6.....	44
Figura 7.....	44
Figura 8.....	45
Figura 9.....	45
Figura 10.....	46

Figura 11.....	47
Figura 12.....	48
Figura 13.....	49
Figura 14.....	50
Discussão.....	52
Conclusão.....	62
Referências bibliográficas.....	63
Anexo I.....	80
Anexo II.....	82

I. CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os estafilococos são cocos Gram-positivos que apresentam um arranjo característico em grupos, lembrando cachos de uva. Medem cerca de 1 μm de diâmetro, são imóveis e incapazes de formar esporos. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é anaeróbia facultativa e não forma gás a partir da quebra de carboidratos. Normalmente, produzem a enzima catalase, o que as diferencia das espécies do gênero *Streptococcus*. Além disso, esses microrganismos toleram altas concentrações de NaCl, e são capazes de crescer em temperaturas que variam de 10 a 45 °C (WILKINSON, 1997; BANNERMAN, 2003).

Atualmente são descritas, pelo menos, 41 espécies e 25 subespécies de *Staphylococcus* (http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genu=STAPHYLOCOCCUS). As espécies mais envolvidas em patologias humanas têm sido *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. Dentre estas, apenas *S. aureus* é capaz de hemolisar o sangue – devido à produção de hemolisinas – e de produzir a enzima coagulase (LEVINSON & JAWETZ, 2005).

A parede celular de *S. aureus* é formada por uma espessa camada de peptidoglicano, constituída de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina unidos firmemente por ligações peptídicas. Esta estrutura é bem conservada nas bactérias Gram-positivas (FOURNIER & PHILPOTT, 2005).

Quando cultivado em meio sólido, *S. aureus* forma colônias grandes, opacas, de aspecto cremoso, medindo de 6 a 8 mm de

diâmetro. As colônias costumam ser brancas, mas sua pigmentação pode variar do amarelo-creme ao laranja (BANNERMAN, 2003).

II. PATOGÊNESE

S. aureus faz parte da microbiota da pele e da mucosa de mamíferos, mas também pode estar presente em vários espécimes clínicos isolados de seres humanos e de outros animais. Pode causar desde infecções brandas, na pele, até infecções mais graves, agudas e piogênicas, que podem disseminar o microrganismo através da corrente sangüínea e comprometer diferentes sítios e a vida do paciente (BANNERMAN, 2003).

O principal reservatório de *S. aureus* em seres humanos é a mucosa nasal. Acredita-se que o desenvolvimento de infecções estafilocócicas esteja, freqüentemente, relacionado a este tipo de colonização (BOKAREWA, JIN & TARKOWSKI, 2006). Em um estudo envolvendo pacientes com bacteremia por *S. aureus*, von Eiff e colaboradores (2001) observaram uma forte correlação entre cepas habitantes da mucosa nasal, cepas isoladas dos focos de infecção e cepas isoladas do sangue, sugerindo que a bacteremia por *S. aureus* possa ter origem endógena.

A partir do sítio primário de infecção, que geralmente é uma lesão na pele, *S. aureus* pode causar infecções como furúnculos, foliculites, celulites, impetigo e infecções pós-operatórias em diversos sítios. Tais infecções podem evoluir, colocando em risco a vida do paciente, levando a quadros de osteomielite, endocardite, pneumonia, pericardite, meningite, septicemia, abscessos no músculo, no trato urogenital, no sistema nervoso central e em vários órgãos intra-abdominais (BANNERMAN, 2003; FOURNIER & PHILPOTT, 2005).

S. aureus pode causar, também, doenças de origem tóxica, como a síndrome do choque tóxico (“toxic shock syndrome” – TSS), a doença exantematosa neonatal semelhante à síndrome do choque tóxico (“neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease” – NTED), a síndrome da pele escaldada (“staphylococcal scalded skin syndrome” – SSSS), o impetigo bolhoso e intoxicação alimentar (“staphylococcal foodborne disease” – SFD) (MURRAY, 2005; IWATSUKI *et al.*, 2006).

III. FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES POR *S. aureus*

Alguns fatores de risco clássicos para predisposição de um indivíduo a infecções graves por *S. aureus* já foram estabelecidos. Tais fatores podem ser: deficiência na quimiotaxia leucocitária congênita (como observado na síndrome de Down) e adquirida (como observado na artrite reumatóide e em *diabetes mellitus*); deficiência na opsonização por anticorpos; dificuldade de destruir o microrganismo no interior da célula logo após a opsonização; traumas na pele sejam por queimadura, incisão cirúrgica ou eczema; introdução ou presença, no organismo, de corpos estranhos, como sutura, catéter, entre outros; infecção por outros agentes; doença crônica; administração profilática ou terapêutica recente de antimicrobianos (KONEMAN *et al.*, 1992).

A colonização por *S. aureus* também pode ser considerada fator de risco para infecções subseqüentes (LOWY, 1998). A associação entre a infecção estafilocócica e o carregamento nasal de *S. aureus* foi primeiramente descrita no ano de 1931, em um estudo sobre furúnculos. Desde então, numerosos estudos vêm confirmando esta relação, demonstrando, inclusive, que a cepa colonizadora possui o mesmo fagotipo ou genótipo que a cepa infecciosa (WERTHEIM *et al.*, 2005).

Os mecanismos que determinam a colonização por *S. aureus* são multifatoriais. Características associadas ao hospedeiro, somadas às propriedades da bactéria, podem ser determinantes para a colonização por esses microrganismos (PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001; NOUWEN *et al.*, 2004; WERTHEIM *et al.*, 2005; VAN DEN AKKER *et al.*, 2006).

A colonização nasal por *S. aureus* é mais estudada que em outros sítios uma vez que as narinas parecem representar o nicho ecológico dominante. De maneira geral, a descolonização das narinas pelo uso de antibióticos tópicos induz a descolonização de outras áreas do corpo previamente colonizadas pelo mesmo microrganismo. Talvez isso se deva às características anatômicas desse sítio. *S. aureus* coloniza, predominantemente, a região anterior das narinas, onde o epitélio é diferente do resto da cavidade nasal e do trato respiratório. Nesta região, a bactéria pode se aderir a células epiteliais estratificadas de forma direta ou através do muco ou de outros constituintes do soro associados a estas células (PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001).

Segundo Wertheim e colaboradores (2005), existem quatro etapas a serem ultrapassadas para um indivíduo se tornar carreador nasal de *S. aureus*: (1) sua região nasal precisa entrar em contato com o microrganismo; (2) o microrganismo precisa aderir a certos receptores neste nicho; (3) o microrganismo precisa vencer as defesas do hospedeiro e, finalmente; (4) o microrganismo precisa ser capaz de se propagar nas narinas.

O contato com o *S. aureus* se dá através da inalação de secreções respiratórias dispersas ou através das mãos, que podem transmitir o microrganismo de outras superfícies para o nariz e vice-versa (WERTHEIM *et al.*, 2005). Já está descrito que carreadores nasais podem dispersar grandes quantidades de *S. aureus* através dos espirros

causados por processos alérgicos e infecções respiratórias (BISCHOFF *et al.*, 2006).

Outros fatores também podem influenciar o carreamento nasal de *S. aureus*, tais como hospitalização recente, contato próximo com outros carreadores e convivência com fumantes (WERTHEIM *et al.*, 2005). Altas taxas de colonização são descritas entre usuários de drogas injetáveis, indivíduos com *diabetes* do tipo 1 ou com AIDS, e entre pacientes de hemodiálise, ou que sofreram intervenção cirúrgica (LOWY, 1998).

A primeira barreira contra os microrganismos são as superfícies da pele e de mucosas. Células epiteliais expressam uma complexa rede de glicoproteínas, glicolípídeos e proteoglicanos. Ausência, presença ou diferenças na expressão de uma ou mais destas moléculas podem ser importantes para a colonização por *S. aureus* (PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001). Até mesmo grupos sanguíneos foram descritos como fator de risco para colonização por *S. aureus*. Em um estudo realizado por Veselov & Malyskhina, em 1988, foi feita uma associação entre o tipo sanguíneo A e o carreamento nasal de *S. aureus* (*apud* PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001). Modificações no micro-ambiente nasal também podem alterar a susceptibilidade à colonização, como elevados níveis de Ca^{+2} (PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001).

Uma vez aderido à mucosa nasal, *S. aureus* precisa transpor uma série de barreiras para permanecer neste sítio. Enquanto a mucina, presente nesta região, parece favorecer a aderência do microrganismo, o hospedeiro libera secreções com componentes antimicrobianos, como imunoglobulina A, G, lisozima, lactoferrina e peptídeos antimicrobianos (WERTHEIM *et al.*, 2005).

Características intrínsecas da bactéria, ou mesmo, adquiridas para melhor competição em um dado ambiente, parecem ser as responsáveis

pela transposição de tais barreiras (PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001). Como exemplo, pode-se citar a resistência intrínseca à lisozima, uma importante proteína bactericida que faz parte da defesa inata contra infecções bacterianas em diversos tecidos do corpo (FOSTER, 2005). A classe de enzima à qual a lisozima pertence – muramidase – hidrolisa pontes glicosídicas entre N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina. Porém, em *S. aureus*, o ácido N-acetilmurâmico do peptidoglicano é O-acetilado na posição C6-OH, tornando a parede celular resistente à lisozima (FOURNIER & PHILPOTT, 2005).

Também é importante ressaltar uma diferença no tipo de colonização: carreadores persistentes são, geralmente, colonizados por uma única cepa de *S. aureus* por longos períodos, enquanto que os carreadores transitórios podem ser colonizados por diferentes cepas em um mesmo período (PEACOCK, DE SILVA & LOWY, 2001; WERTHEIM *et al.*, 2005). Em um estudo realizado na Holanda, cepas encontradas nas narinas de alguns indivíduos, em 1988, assemelharam-se geneticamente a cepas encontradas nos mesmos indivíduos oito anos mais tarde (VANDENBERGH *et al.*, 1999).

Em um outro estudo, também realizado na Holanda, carreadores nasais persistentes e não-carreadores foram inoculados com uma mistura contendo cepas diferentes de *S. aureus*. A maioria dos não-carreadores voltou ao estado não-carreador depois de certo tempo, enquanto que a maior parte dos carreadores persistentes voltou a ser colonizada por sua cepa original. Estes dados sugerem que os fatores que determinam se um carreador é persistente ou não parecem estar relacionados a características do indivíduo (NOUWEN *et al.*, 2004).

IV. DIVERSIDADE GENÉTICA

Em virtude do desenvolvimento de técnicas moleculares para tipagem de microrganismos, vários estudos sobre a diversidade genética de microrganismos têm sido realizados a fim de se compreender melhor aspectos biológicos de agentes infecciosos, assim como a epidemiologia das doenças relacionadas, o que contribui para o controle da disseminação do microrganismo tanto em hospitais quanto na comunidade (TENOVER *et al.*, 1995).

Uma variedade de métodos moleculares de tipagem tem sido utilizada para estudar a epidemiologia de *S. aureus*. Dentre os métodos disponíveis, a eletroforese em gel de campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis” – PFGE) tem sido considerada a metodologia “padrão ouro” para tipagem deste microrganismo. Nesta técnica, preparações do DNA cromossômico de cada amostra são submetidas a cortes realizados por enzimas de restrição. Os fragmentos gerados pela ação de tais enzimas são separados em um gel de eletroforese submetido a pulsos elétricos lançados de diferentes direções. Os perfis de bandas de cada amostra são comparados entre si, com o objetivo de se avaliar a relação epidemiológica entre as mesmas (BANNERMAN *et al.*, 1995; TENOVER *et al.*, 1995).

A maioria das investigações epidemiológicas acerca de colonização nasal por *S. aureus* tem confiado na pesquisa de apenas uma única colônia originada de uma cultura positiva. Características fenotípicas e genotípicas desta colônia única são testadas e os resultados podem mascarar a realidade (CESPEDES *et al.*, 2005). A utilização de PFGE na pesquisa de várias colônias de cepas envolvidas em uma infecção tem sido mais utilizada em estudos de doenças causadas por estafilococos coagulase-negativos (VAN ELDERE *et al.*, 2000).

Em um estudo de clonalidade de *S. aureus* em carreamento nasal, Céspedes e colaboradores (2005) realizaram testes fenotípicos e moleculares em três colônias isoladas de cada cultura positiva obtida de processo infeccioso. Um dos testes moleculares utilizados foi a PFGE, através do qual as amostras foram consideradas como tipos distintos ao apresentarem diferença em mais de três bandas entre si. Os resultados demonstraram a diversidade genética entre essas colônias. Com relação à susceptibilidade a antimicrobianos, os autores puderam observar que amostras obtidas de um mesmo indivíduo continham colônias resistentes à meticilina e colônias sensíveis.

Com estes dados e através de um modelo matemático, Céspedes e colaboradores (2005) concluíram que aproximadamente 6,6% dos indivíduos colonizados por *S. aureus* carregam mais de uma cepa diferente em suas narinas. Eles sugerem, inclusive, que estudos sobre o carreamento de uma única cepa na colonização nasal persistente possam estar refletindo um erro na amostragem, devido à falta de investigação de outras cepas envolvidas na colonização.

A análise da diversidade clonal na colonização por *S. aureus* é muito importante, pois a presença de mais de uma cepa diferente aumenta o potencial da bactéria para a troca horizontal de informações genéticas, incluindo a troca de genes de resistência a antimicrobianos ou de determinantes de virulência (CESPEDES *et al.*, 2005).

V. FATORES DE VIRULÊNCIA

Para se adaptar, ou seja, conseguir sobreviver e se multiplicar no organismo do hospedeiro, *S. aureus* possui um arsenal de fatores de

virulência, os quais não são encontrados obrigatoriamente em todas as cepas. Uma vez rompida a barreira da pele ou de mucosas, a primeira linha de defesa do organismo, contra *S. aureus*, são os neutrófilos. No entanto, sabe-se que este microrganismo é capaz de escapar da defesa inata de várias formas. Além disso, ele secreta proteínas imunomoduladoras que comprometem tanto a resposta imune humoral quanto a celular (FOSTER, 2005).

Com seus fatores de virulência, *S. aureus* consegue promover a sua aderência à superfície do hospedeiro, burlar os mecanismos de defesa do organismo, disseminar-se pelo tecido e causar danos graves ao hospedeiro (Foster, 2005).

Dentre os principais fatores de virulência já descritos para *S. aureus*, estão os componentes da superfície microbiana que se ligam a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, as chamadas MSCRAMMs ("microbial surface components recognizing adhesive matrix"), das quais fazem parte as proteínas de ligação à fibronectina A e B, o fator "clumping" A e B, dentre outras (PATTI *et al.*, 1994; SINHA *et al.*, 1999; ENTENZA *et al.*, 2000; TUNG *et al.*, 2000; CLARKE *et al.*, 2002; DOWNER *et al.*, 2002; FOSTER, 2005, HAUCK & OHLSEN, 2006).

Outro importante fator de virulência é a proteína A que reconhece a porção Fc das imunoglobulinas G, deixando livre o domínio de reconhecimento de antígenos. Com esta interação, a bactéria se reveste por moléculas de IgG que não estão expondo seu sítio Fc para haver o reconhecimento pelos neutrófilos (UHLÉN *et al.*, 1984; NAVARRE & SCHNEEWIND, 1999; FOSTER, 2005).

Muitas cepas de *S. aureus* isoladas de espécimes clínicos expressam uma fina camada polissacarídica em sua superfície. Esta estrutura, conhecida como cápsula, é responsável pela evasão do

sistema fagocitário do hospedeiro (WILKINSON, 1997; BANNERMAN, 2003; O'RIORDAN & LEE, 2004; FOSTER, 2005).

Ainda na superfície bacteriana, encontram-se distribuídas por toda a extensão da célula, porções de ácido teicóico, responsáveis pela aderência do microrganismo às células da mucosa (WEIDENMAIER *et al.*, 2004).

A coagulase é uma enzima capaz de coagular o plasma pela ativação da protrombina. Ela reconhece fibrinogênio, ao qual se ligam os complexos coagulase-protrombina, e converte fibrinogênio em fibrina, resultando na formação do coágulo. Este processo dificulta o acesso do sistema imune hospedeiro ao microrganismo (PALMA *et al.*, 1998; LEVINSON & JAWETZ, 2005).

A estafiloquinase forma um complexo com o plasminogênio, provocando a ativação da plasmina, uma enzima proteolítica que cliva a rede de fibrina ao redor do foco infeccioso ou abscesso, facilitando a disseminação bacteriana pelos tecidos adjacentes (BOKAREWA, JIN & TARKOWSKI, 2006).

A catalase é uma enzima produzida normalmente no gênero *Staphylococcus*. Funciona como um mecanismo de defesa bacteriano contra o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais livres, liberados pelas células fagocíticas após a ingestão do microrganismo (LEVINSON & JAWETZ, 2005).

Ainda como parte do arsenal de fatores de virulência de *S. aureus* pode-se citar a hialuronidase (HYNES & WALTON, 2000), as lipases (PROJAN & NOVICK, 1997) e seus diferentes tipos de hemolisinas (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000).

Algumas cepas de *S. aureus* apresentam toxinas consideradas superantígenos, como as enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (MURRAY, 2005).

Existem cepas de *S. aureus* que produzem uma toxina associada a lesões cutâneas necrotizantes, como furúnculos ou abscessos primários, e a quadros de pneumonia hemorrágica necrotizante: a leucocidina Panton-Valentine (PVL). Esta citotoxina, presente em apenas 2% das amostras clínicas isoladas de *S. aureus*, possui atividade citolítica com alta especificidade por leucócitos, revelada pela formação de poros nas membranas destas células. Há relatos de pneumonias, envolvendo cepas produtoras de PVL, que evoluíram rapidamente, levando à morte indivíduos saudáveis, sem qualquer fator de risco aparente (KANEKO & KAMIO, 2004; FRAZEE *et al.*, 2005).

A PVL é uma toxina bicomponente, composta pelas unidades LukS-PV e LukF-PV. Estas são codificadas pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, localizados no *locus pvl*, presente no genoma de um bacteriófago (KANEKO & KAMIO, 2004).

O potencial virulento da PVL já foi questionado. Voyich e colaboradores (2006) realizaram uma pesquisa na qual infectaram camundongos com cepas selvagens PVL+ e PVL-, e com cepas mutantes, que perderam os genes codificadores desta toxina. Os pesquisadores relataram que os resultados não apontaram diferença significativa na gravidade das infecções causadas por tais cepas. Logo após a publicação deste trabalho, Labandeira-Rey e colaboradores (2007) publicaram um estudo no qual camundongos foram expostos a diversos tipos de contato com cepas PVL+, PVL-, mutantes que perderam os genes *lukS-PV* e *lukF-PV* e mutantes que adquiriram estes genes. O resultado deste estudo foi intensa destruição tecidual, morbidade e elevada taxa de mortalidade em todos os casos em que a cepa produzia a leucotoxina, contrapareando os dados publicados anteriormente.

VI. TRATAMENTO E RESISTÊNCIA A DROGAS

Nos dias de hoje, a prática terapêutica para as infecções estafilocócicas, tem sido uma problemática, uma vez que a bactéria adquire, em pouco tempo, mecanismos de resistência às drogas de escolha.

A ampla utilização da penicilina proporcionou uma pressão seletiva sobre *S. aureus*, garantindo a sobrevivência e disseminação de cepas produtoras de β -lactamase. Esta enzima, cuja produção é mediada por um plasmídio, hidrolisa o anel β -lactâmico das penicilinas, inativando sua capacidade antibacteriana (THORNSBERRY, 1988; TAVARES, 2002).

Nos anos 50, 80% das amostras hospitalares de *S. aureus* eram resistentes à penicilina devido a produção de β -lactamases por esses microrganismos. Na década de 1970, essa resistência já era elevada tanto em espécimes hospitalares quanto em comunitários (CHAMBERS, 2001; TAVARES, 2002).

Durante os anos 40 e 50, a resistência a outros agentes antimicrobianos também foi relatada, normalmente em combinação com a resistência à penicilina, sendo detectadas, desde então, as cepas multirresistentes (THORNSBERRY, 1988).

Em 1961, a meticilina e a oxacilina foram introduzidas na terapêutica de infecções por estafilococos, minimizando um pouco o problema da resistência (THORNSBERRY, 1988). Estas penicilinas semi-sintéticas, que já foram chamadas de anti-estafilocócicas, são β -lactâmicos resistentes às β -lactamases (TAVARES, 2002). Entretanto, ainda no ano de 1961, surgiu o primeiro relato de resistência à meticilina (WERTHEIM *et al.*, 2005).

Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram se disseminando pelo mundo inteiro (ITO *et al.*, 2003), e passaram a ser bastante relatadas em situações que envolviam o ambiente hospitalar.

Estas cepas adquiriram o cassete cromossômico estafilocócico ("staphylococcal cassette chromosome *mec*" – SCC*mec*), que se integrou ao seu DNA carregando o gene *mecA*. Este elemento móvel não possui região *tra*, responsável pela transferência conjugativa de material genético. No entanto, ele conta com os genes *ccrA* e *ccrB* que codificam recombinases responsáveis pela excisão e inserção do material genético em um ponto exato do cromossoma – o sítio *attBSCC*, localizado próximo à origem de replicação, sendo esta uma região conservada entre amostras clínicas de *S. aureus* (ITO *et al.*, 2001; EADY & COVE, 2003).

O gene *mecA* codifica uma nova proteína de ligação à penicilina, denominada PBP2a ou PBP2', cuja afinidade de ligação aos β -lactâmicos é baixa. A PBP2a é uma transpeptidase capaz de concluir a síntese de parede celular mesmo na presença do antimicrobiano β -lactâmico (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). A expressão do gene *mecA* é controlada por duas proteínas regulatórias, codificadas pelos genes *mecR1* e *mecI*, situados "upstream" ao gene *mecA* no genoma (EADY & COVE, 2003).

MecR1 é uma proteína sinalizadora de membrana que possui um domínio extracelular, o qual possui afinidade por β -lactâmicos, e um domínio citoplasmático, com atividade de protease. MecI é uma proteína que, em condições normais de crescimento bacteriano, reprime a transcrição de *mecA*. Na presença do antibiótico β -lactâmico, MecR1 se liga a moléculas da droga com o seu domínio extracelular levando sua fração citoplasmática a quebrar MecI, permitindo, desta maneira, a transcrição de *mecA*. Desta forma, a nova PBP passa a ser expressa, tornando-se responsável pelo processo de manutenção da síntese da parede celular bacteriana, na presença do β -lactâmico, enquanto este está bloqueando as PBPs originais (EADY & COVE, 2003).

SCC*mec* é diferente de outros elementos genéticos móveis, como bacteriófagos, transposons, transposons conjugativos ou plasmídeos. Este elemento é considerado uma ilha genômica de resistência (HIRAMATSU *et al.*, 2002).

A origem do SCC*mec* ainda é desconhecida. Os hospitais são ecossistemas convenientes para a transferência de genes, uma vez que há sempre uma intensa troca de pacientes, com leitos próximos, inúmeros reservatórios e uma forte pressão seletiva pelo uso de antibióticos. Suspeita-se que a transferência de SCC*mec* para cepas *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) tenha ocorrido de forma horizontal, a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos contendo este elemento (HANSSEN & SOLLID, 2006).

Na busca pela possível origem do gene *mecA*, foi identificado um elemento genético muito próximo a este em espécies de *Staphylococcus sciuri*, um comensal de animais (KLOOS *et al.*, 1997). Em um estudo realizado por Wu e colaboradores, em 1996, este elemento apresentou 79,5% de similaridade, em sua seqüência de DNA, com o gene *mecA* de uma cepa de *S. aureus* multirresistente, sugerindo que estes determinantes genéticos sejam muito próximos evolutivamente (*apud* COUTO *et al.*, 2003). Apesar disto, a maioria das cepas de *S. sciuri* é susceptível a antibióticos β -lactâmicos, incluindo a meticilina (COUTO *et al.*, 1996). Curiosamente, Couto e colaboradores (2003) encontraram cepas de *S. sciuri*, isoladas de espécimes humanos, com níveis significantes de resistência à meticilina.

Já foram descritos diferentes alotipos de SCC*mec*, variando do tipo I ao tipo VI. Esta classificação depende das características dos complexos *mec* e *ccr* que eles possuem (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2003; ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006). O gene *mec* é composto pela seqüência de inserção IS431*mec*, *mecA*, e os genes regulatórios *mecR1* e *mecI*. Desta forma, os

complexos *mec* são organizados em diferentes classes, dependendo de sua estrutura: classe A (IS431-*mecA-mecR1-mecI*); classe B (IS431-*mecA-ΔmecR1-IS1272*); classe C (IS431-*mecA-ΔmecR1-IS431*) e classe D (IS431-*mecA-ΔmecR1*). Existem 4 alotipos para cada gene *ccrA* e *ccrB* (*ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*, e *ccrA4* para *ccrA*, e *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, e *ccrB4* para *ccrB*) e ainda, uma recombinase recentemente descrita, a *ccrC* (ITO *et al.*, 2004). Estas regiões são utilizadas como alvos para tipagem molecular e polimorfismos nestas regiões, particularmente na região “downstream” aos genes *ccrAB* (região J1), definem subtipos ou variantes de SCC*mec* (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

O SCC*mec* tipo I (composto de complexo de gene *mec* classe B e complexo *ccr* tipo 1) não carrega nenhum gene de resistência além do *mecA*. Os SCC*mec* tipo II (composto de complexo de gene *mec* classe A e complexo *ccr* tipo 2) e SCC*mec* tipo III (composto de complexo de gene *mec* classe A e complexo *ccr* tipo 3) carregam múltiplos genes de resistência e o *mecA* (ITO *et al.*, 2001). O SCC*mec* tipo IV, o menor dos elementos SCC*mec* descritos (composto de complexo de gene *mec* classe B e complexo *ccr* tipo 2), não carrega outros genes de resistência além do *mecA*. Além disso, ele possui alguns subtipos (IVa, IVb, IVc e IVd), baseando-se na sua região J (parte do SCC*mec* “downstream” aos genes *mec* e *ccr*), sugerindo que seja altamente transmissível. O SCC*mec* tipo V é um pouco maior que o tipo IV, mas não chega a ser do tamanho do tipo I. Este elemento (composto de complexo de gene *mec* classe A e complexo *ccrC*) possui apenas *mecA* como gene de resistência a antibióticos (ITO *et al.*, 2004; HANSEN & SOLLID, 2006). O último SCC*mec* descrito, tipo VI (composto por complexo de gene *mec* classe B, complexo *ccr* tipo 4 e uma região J1 característica) não carrega outros genes de resistência além do *mecA* (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

Os elementos SCCmec dos tipos I, II e III têm sido mais isolados de infecções com origem hospitalar, especialmente o tipo III. Os tipos IV e V costumam ser mais encontrados em infecções comunitárias (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2003). Entre as cepas comunitárias prevalece o SCCmec IV (RIBEIRO *et al.*, 2005). Os clones com o SCCmec tipo VI foram isolados em um hospital pediátrico em Portugal (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

O MRSA foi considerado por muito tempo um patógeno tipicamente hospitalar. Em 1998, cepas de MRSA representavam 40% das amostras de *S. aureus* isoladas de hospitais nos Estados Unidos (GROOM *et al.*, 2001) e, atualmente, significam de 28 a 37,8% das amostras de *S. aureus* isoladas de hospitais no Brasil (SADER *et al.*, 2004; BRITES, SILVA & SAMPAIO-SA, 2006). No entanto, o aumento de casos de *S. aureus* resistentes à meticilina adquiridos na comunidade (CA-MRSA) vem sendo descrito desde a década de 1980 e alterou este conceito (EADY & COVE, 2003).

Alguns estudos específicos demonstram que certos fatores como hospitalização recente, contato íntimo com indivíduos que tenham sido hospitalizados, ou antibioticoterapia prévia não estão relacionados aos casos de infecções por CA-MRSA (GROSS-SCHULMAN *et al.*, 1998; L'HERITEAU *et al.*, 1999). A exposição direta ou indireta a um ambiente hospitalar, no qual amostras de MRSA podem ser encontradas, e outros fatores de risco tipicamente associados com a colonização por MRSA não estão presentes em muitos dos relatos, nos quais MRSA parece ter sido adquirido de indivíduos colonizados da própria comunidade. Um perfil mais amplo de susceptibilidade aos antimicrobianos, observado nestas amostras de CA-MRSA é, também, evidência de uma possível origem comunitária (CHAMBERS, 2001).

Já foi sugerido que o MRSA nosocomial dificilmente consegue se estabelecer na comunidade devido à lentidão no seu processo de

replicação celular, o que selecionaria negativamente estas amostras, restringindo-as ao meio hospitalar (ROBINSON & ENRIGHT, 2003). Cepas com *SCCmec* tipo IV, V e VI têm menor custo para a sua manutenção porque carregam apenas genes estruturais e regulatórios para a resistência à meticilina, e os genes da recombinase para mover o elemento. Por outro lado, *SCCmec* tipos I a III carregam genes adicionais, como os de resistência a antibióticos não β -lactâmicos e a metais pesados. A possibilidade das cepas com *SCCmec* tipos IV-VI apresentarem resistência à meticilina (importante diferencial), e ainda de se multiplicarem com mais rapidez (devido ao pequeno tamanho desses elementos) as torna capazes de competir na comunidade, inclusive na microbiota normal de seres humanos (MA *et al.*, 2002). No entanto, a falta de genes de resistência a antibióticos, teoricamente, dificultaria o estabelecimento de CA-MRSA em ambiente hospitalar, devido à intensa administração de diferentes antimicrobianos neste meio (CARLETON *et al.*, 2004). Fato curioso é que alguns clones de CA-MRSA do tipo IV, estão se propagando de forma acelerada em hospitais do mundo inteiro (SÁ-LEÃO *et al.*, 1999; MCDUGAL *et al.*, 2003; HALLIN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2008).

Os clones de MRSA estão totalmente disseminados pelo mundo. Em um estudo de caracterização de 3.067 amostras de MRSA isoladas de hospitais da Europa, América Latina e Estados Unidos, foi concluído que 70% de tais amostras poderiam ser classificadas em 5 tipos clonais bem descritos: Clone Ibérico, Clone Brasileiro, Clone Húngaro, Clone Nova Iorque/Japonês e Clone Pediátrico (OLIVEIRA, THOMASZ & DE LENCASTRE, 2001). Modelos matemáticos têm demonstrado que CA-MRSA possui grande potencial para se tornar endêmico na comunidade, o que complicaria o controle de MRSA em hospitais (KLUYTMANS-VANDEBERGH & KLUYTMANS, 2006).

Herold e colaboradores, em 1998, publicaram um estudo, realizado em Chicago, sobre a taxa de infecções por CA-MRSA em crianças sem risco prévio e obtiveram dados como um aumento de 25% para 62,5% do número de amostras deste microrganismo em coletas realizadas em 1988-1990 e 1993-1995, respectivamente.

Recentemente, foram descritos, por Ribeiro e colaboradores (2005), os primeiros casos de infecções envolvendo cepas de CA-MRSA no Brasil. Neste estudo, realizado com cinco amostras de diferentes indivíduos sem risco prévio aparente, foi verificado que quatro destas possuíam perfis genéticos relacionados, quando analisados pelo método PFGE. Ao serem submetidas ao método "Multilocus Sequence Typing" (MLST), verificou-se que o tipo de CA-MRSA que estava se disseminando no Brasil era originário de um clone vindo da Austrália.

Os fatores de risco para a aquisição de CA-MRSA são desconhecidos (RIBEIRO *et al.*, 2005), enquanto que exposição ao ambiente hospitalar ou indivíduos hospitalizados são considerados os principais fatores de risco para aquisição de MRSA adquirido em hospital, ou HA-MRSA (CHAMBERS, 2001).

Cepas de CA-MRSA podem causar infecções brandas, acometendo a pele e os tecidos moles (EADY & COVE, 2003), e também, comprometer o paciente de forma mais grave, originando bacteremias e pneumonias severas. Os casos de pneumonia por CA-MRSA podem ser fatais e estão associados à PVL, por sua capacidade de necrose pulmonar (VANDENESCH *et al.*, 2003).

Muito se tem pesquisado na busca de um marcador comum a todas as cepas de CA-MRSA. Ainda não foi descrito um que esteja presente em todas elas, a não ser o próprio elemento *SCCmec* determinante da característica de resistência à meticilina e sem os demais genes de multirresistência. Como já mencionado, muitas cepas de CA-MRSA vêm apresentando os genes para a PVL, raramente

encontrados em cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA). No entanto, não se pode determiná-los como marcadores estáveis. Alguns pesquisadores chegaram a sugerir que CA-MRSA tenha surgido da inserção do elemento *mec* do tipo IV em uma cepa de MSSA que apresentava a PVL, hipótese altamente vantajosa para os clones que apresentam ambas as características (EADY & COVE, 2003).

Em um estudo realizado na França, foi demonstrada essa seleção positiva de clones de CA-MRSA contendo PVL. Apesar de haver um clone que predominava, foram descritas diferentes linhagens de microrganismos em cada um dos três continentes pesquisados (América do Norte, Europa e Oceania). Os responsáveis por este estudo sugeriram que a disseminação clonal das cepas de CA-MRSA seja pouco provável. Segundo eles, é bem possível que tenha havido co-evolução de cepas de CA-MRSA e, estas, pelo *background* genético não parecem ter se originado de MRSA adquiridas em hospitais locais (VANDENESCH *et al.*, 2003). No entanto, dados mais recentes sugerem o contrário, devido à predominância de certo clone em diferentes partes do mundo (RIBEIRO *et al.*, 2005).

É necessário que haja um maior número de estudos na comunidade para que melhor se possa compreender a ecologia, patofisiologia e epidemiologia do carreamento nasal e infecções por *S. aureus*. Com dados desta natureza, podem-se desenvolver estratégias e tomar medidas preventivas que visem solucionar o problema das altas taxas de MRSA em hospitais e evitar que infecções por CA-MRSA se expandam ainda mais (WERTHEIM *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

Os estudantes da Escola de Enfermagem da UFRJ são oriundos de diversas partes da cidade e do estado do Rio de Janeiro. A pesquisa de portadores nasais de *S. aureus* entre estes estudantes pode refletir a taxa de colonização da população fluminense. O conhecimento dos clones de *S. aureus* circulantes na comunidade é fundamental para a investigação do processo de aquisição de resistência à meticilina entre cepas que hoje são sensíveis. Sendo assim, este estudo apresentou os seguintes objetivos:

- Determinar a taxa de colonização por *S. aureus* em estudantes do curso de graduação em enfermagem, dos primeiros períodos (que ainda não frequentam hospitais) e entre os que cursam os últimos períodos (já estagiando em hospitais);
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos entre as amostras isoladas;
- Caracterizar as cepas MRSA através da tipagem do *SCCmec*;
- Pesquisar presença de leucocidina Panton-Valentine entre colônias de MRSA;
- Comparar a prevalência de MRSA entre a comunidade que mantém e a que não mantém contato acadêmico com o ambiente hospitalar;
- Pesquisar, através de PFGE, a diversidade genética entre colônias isoladas de um mesmo espécime clínico, no caso de confirmação de MRSA;
- Verificar a diversidade genética entre as amostras de *S. aureus* isoladas dos diferentes estudantes, através de PFGE;
- Avaliar possíveis fatores de risco para a colonização por *S. aureus* e para a aquisição de CA-MRSA.

I. DESENHO DO ESTUDO

Dados demográficos e “swabs” nasais foram coletados de dois grupos de estudantes do curso de graduação em Enfermagem e Obstetrícia da UFRJ. O primeiro grupo foi composto por estudantes que freqüentavam o ciclo básico e ainda não haviam tido contato **acadêmico** com o ambiente hospitalar – o que não exclui a possibilidade de alguns destes já trabalharem em hospitais. O segundo grupo compreendeu estudantes dos últimos períodos do curso que já tinham contato com o ambiente hospitalar. A coleta foi realizada entre os meses de junho de 2005 e novembro de 2006.

Foram obtidos 301 espécimes clínicos no total, dos quais 201 eram de estudantes do primeiro grupo e 100, de estudantes do segundo grupo. As amostras de *S. aureus* isoladas foram caracterizadas através de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, triagem para a pesquisa de resistência à metilina, reação da polimerase em cadeia (PCR) para se verificar a presença dos genes *mecA* e *lukS-PV-lukF-PV*, e PFGE para estudos de diversidade genética.

II. COLETA DO ESPÉCIME CLÍNICO

Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo I), os estudantes responderam a um questionário (anexo II) visando a obtenção de informações epidemiológicas como idade, sexo, período do curso que freqüentam, doença pré-existente, hospitalização prévia, contato com paciente hospitalizado, uso de antibiótico, uso de

corticosteróide nasal ou oral, residência com indivíduos que tenham contato com hospitais e residência com crianças. Após o preenchimento do questionário, os espécimes foram coletados das narinas dos indivíduos com o auxílio de um "swab" esterilizado umedecido em solução salina fisiológica, o qual foi processado no laboratório em, no máximo, duas horas.

III. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

O isolamento de *S.aureus* foi feito a partir da semeadura do material contido no "swab" em meio de ágar manitol salgado (Difco, Detroit, EUA) e incubação em aerobiose a 35 °C durante 24-48 horas.

Cinco colônias fermentadoras de manitol foram isoladas e repicadas para placas contendo meio "Tryptcase Soy Agar" (TSA, Difco, Detroit, EUA). As colônias re-isoladas foram submetidas à coloração de Gram e os cocos Gram-positivos submetidos ao teste da catalase. Quando catalase-positivas, as colônias suspeitas foram identificadas através do teste da coagulase (WINN JR. *et al.*, 2006). Após a identificação, as amostras foram estocadas em leite desnatado (10%, Molico, Nestlé) adicionado de glicerol (10%) a -20 °C.

IV. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

IV. 1. Teste de difusão em ágar

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada através do método de difusão em ágar, seguindo as recomendações do National

Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004) e do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).

Para o preparo do inóculo algumas colônias bem isoladas foram selecionadas do meio contendo cultura pura do microrganismo em estudo. Tais colônias foram transferidas para um tubo contendo salina estéril e a turbidez da suspensão obtida foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (NCCLS, 2004).

Um "swab" estéril foi embebido na suspensão contendo o inóculo e semeado na superfície do ágar Mueller-Hinton, a fim de se formar um tapete de bactérias sobre toda a superfície do ágar. Em seguida, após um tempo de espera de três a cinco minutos com a placa entreaberta, foram depositados, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de papel de filtro contendo concentrações padronizadas de antibióticos (NCCLS, 2004).

Os agentes antimicrobianos testados foram: cefoxitina (30 μ g), clindamicina (2 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), clorafenicol (30 μ g), eritromicina (15 μ g), gentamicina (10 μ g), nitrofurantoína (300 μ g), norfloxacina (10 μ g), oxacilina (1 μ g), penicilina G (10 UI), rifampicina (5 μ g), sulfazotrim (25 μ g), tetraciclina (30 μ g), trimetoprim (5 μ g) e vancomicina (30 μ g), obtidos da CECON (São Paulo, Brasil), e linezolida (30 μ g), obtida da Oxoid (Basingstoke, Hants, Inglaterra).

A cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle dos testes.

IV. 2. Teste de triagem para resistência à oxacilina

Para triagem de microrganismos resistentes à meticilina, a observação de resistência à oxacilina e cefoxitina foi utilizada como parâmetro no teste de disco-difusão.

A susceptibilidade à meticilina foi, também, verificada pelo teste de triagem para resistência à oxacilina recomendado pelo NCCLS (2004).

Algumas colônias bem isoladas foram selecionadas do meio contendo cultura pura do microrganismo em estudo para o preparo do inóculo. Tais colônias foram transferidas para um tubo contendo salina estéril e a turbidez da suspensão obtida foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (NCCLS, 2004).

Um "swab" estéril foi embebido na suspensão contendo o inóculo e, com ele, foi feito um "spot" de 15 mm de diâmetro na placa de agar Mueller-Hinton adicionada de NaCl a 4% e 6 µg/mL de oxacilina. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. Qualquer crescimento na placa indicou resistência à oxacilina (NCCLS, 2004). As cepas utilizadas como controle foram USA100 para o positivo e ATCC 25923 para o controle negativo.

V. DETECÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À METICILINA (*mecA*) E CARACTERIZAÇÃO DO CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*)

V. 1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de lise térmica descrito por Pacheco e colaboradores (1997), com algumas modificações. As amostras foram semeadas em meio de ágar sangue e incubadas à 37 °C em aerobiose durante 24 horas. A partir deste crescimento, foi preparada uma suspensão em 3,0 mL de tampão TE [(Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0)]. Uma alíquota da suspensão foi diluída dez vezes em água destilada para determinação da densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 600 nm. Para a DO de

0,04, um volume de 200 µL da suspensão original foi centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos. Após o descarte do sobrenadante, 200 µL de tampão TE foram adicionados ao sedimento e esta nova suspensão submetida à fervura por 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e, o sobrenadante, separado para ser utilizado como fonte de DNA nas reações de amplificação. A cepa controle utilizada nesta etapa foi a ATCC 25923.

V. 2. Amplificação do gene *mecA* e tipagem do SCC*mec*

A detecção do gene *mecA* e a caracterização do SCC*mec* foram realizadas em uma única reação de PCR segundo Zhang e colaboradores (2005), com algumas modificações.

As reações consistiram de um volume final de 25 µL contendo: 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1 mM de MgCl₂, 100 mM de cada nucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), concentrações específicas de cada iniciador, 2U de *Taq* polimerase e 2 µL do extrato de DNA (todos os reagentes, exceto os iniciadores, foram obtidos da Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados os seguintes iniciadores, específicos para o gene *mecA* e para os tipos e subtipos de SCC*mec* I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd e V, e nas seguintes concentrações:

- *mecA*: 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-3' e
5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3' (46 nM, cada);
- SCC*mec* I: 5'-GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG-3' e
5'-GTTCTCTCATAGTATGACGTCC-3'(48 nM, cada);
- SCC*mec* II: 5'-CGTTGAAGATGATGAAGCG-3' e
5'-CGAAATCAATGGTTAATGGACC-3' (32 Nm, cada);
- SCC*mec* III: 5'-CCATATTGTGTACGATGCG-3' e
5'-CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG-3' (40 nM, cada);
- SCC*mec* IVa: 5'-GCCTTATTCGAAGAAACCG-3' e

- 5'-CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG-3' (104 nM, cada);
- *SCCmec* IVb: 5'-TCTGGAATTACTTCAGCTGC-3' e
5'-AAACAATATTGCTCTCCCTC-3' (92 nM, cada);
 - *SCCmec* IVc: 5'-ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC-3' e
5'-TTGGTATGAGGTATTGCTGG-3' (78 nM, cada);
 - *SCCmec* IVd: 5'-CTCAAATACGGACCCCAATACA-3' e
5'-TGCTCCAGTAATTGCTAAAG-3' (280 nM, cada);
 - *SCCmec* V: 5'-GAACATTGTTACTTAAATGAGCG-3' e
5'-TGAAAGTTGTACCCTTGACACC-3' (60 nM, cada)
(todos obtidos da Imprint, Campinas, SP, Brasil).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied BioSystems, Foster City, CA, Estados Unidos) e consistiram de 10 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 65 °C por 45 segundos e 72 °C por 1,5 minuto, seguidos por 25 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 1,5 minuto. Uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos e uma de extensão final de 72 °C por 10 minutos foram realizadas.

A visualização dos produtos foi realizada através da eletroforese em gel de agarose a 2% (Ultrapure, Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (0,05 mM de Tris, 1,25 mM de EDTA, 0,05 M de ácido bórico) a 110 V. O gel foi submerso em solução contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL e observado sob luz ultra violeta. Um marcador de 100 pb (Invitrogen) foi utilizado para estimar o tamanho dos produtos obtidos. Os tamanhos dos produtos da amplificação esperados eram de: 147 pb (*mecA*), 613 pb (*SCCmec* I), 398 pb (*SCCmec* II), 280 pb (*SCCmec* III), 776 pb (*SCCmec* IVa), 493 pb (*SCCmec* IVb), 200 pb (*SCCmec* IVc), 881 pb (*SCCmec* IVd) e 325 pb (*SCCmec* V). As cepas controles utilizadas

foram USA100, para SCCmec II, HU25 para SCCmec III e WB45 para SCCmec IVa.

VI. DETECÇÃO DOS GENES PARA LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE (*lukS-PV-lukF-PV*)

VI. 1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada como descrito no item V.1.

VI. 2. Amplificação do gene *lukS-PV-lukF-PV*

A detecção dos genes que codificam a leucocidina Panton-Valentine foi realizada como descrito por von Eiff e colaboradores (2004), com algumas modificações.

A reação consistiu de um volume de 25 µL contendo: 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada nucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 500 nM de cada iniciador, 0,5U de *Taq* polimerase e 2 µL do extrato de DNA (todos os reagentes, exceto os iniciadores foram obtidos da Invitrogen). Os iniciadores utilizados foram os seguintes: 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3' e 5'-GCATCAATGTATTGG ATAGCAAAAGC-3'.

As reações de amplificação consistiram de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, além de uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos e uma de extensão final de 72 °C por 10 minutos. A cepa de *S. aureus* 065 foi utilizada como controle positivo. A visualização dos produtos foi realizada como descrito

no item V.2. O tamanho dos produtos da amplificação esperado foi de 433 pb (*lukS-PV-lukF-PV*).

VII. ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO (PFGE)

A diversidade genética das amostras de *S. aureus* foi determinada pela análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico, através do método de PFGE, segundo Rabello e colaboradores (2005), com algumas modificações.

As amostras de *S. aureus* foram semeadas em placas contendo o meio TSA e incubadas à 37 °C por 24 horas. A partir deste crescimento, foi preparado um inóculo com 500 µL de tampão PIV (NaCl 1,0 M, Tris-HCL 10 mM, pH 7,6) com turvação equivalente ao grau 8 da escala de Mc Farland. Este inóculo foi misturado a um volume igual de agarose de baixa temperatura de fusão (Nu Sieve GTG Agarose, FMC BioProducts, Filadélfia, PA, EUA) a 2% em PIV e distribuído em moldes para a obtenção de blocos.

Após resfriamento dos blocos à 4° C, estes foram tratados com uma solução de lise (NaCl 1 M, EDTA 100 mM, Brij-58 0,5%, desoxicolato de sódio 0,2%, N-lauril-sarcosina 0,5%, Tris-HCl 6 mM, pH 7,5) contendo 20 µg/mL de lisostafina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubados à 37 °C por 18 a 24 horas sob suave agitação.

A solução de lise foi substituída por 2,0 mL de solução ES (EDTA 0,5 M, N-lauril-sarcosina 1%) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma) e incubada à 50 °C por 18 a 24 horas.

Após incubação, os blocos foram lavados com 3,0 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 0,1 mM) 7 vezes, e incubados à 37 °C nos intervalos, por uma hora, sob suave agitação.

Posteriormente, 3 blocos de cada amostra foram tratados com 200 µL da solução tampão específica para a enzima de restrição *Sma*I (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, EUA) à 25 °C durante 1 hora (20 µL de tampão A 10X concentrado + 180 µL de H₂O milliQ estéril). O tampão foi removido e adicionado novo tampão, em mesma quantidade, contendo 20 U de *Sma*I, sendo os blocos incubados à 26 °C por 18 a 24 horas.

O tampão contendo *Sma*I foi removido e os blocos de agarose foram fundidos à 72 °C para posterior aplicação em gel de agarose a 1% (SeaKem GTG Agarose, FMC BioProducts) em tampão TBE 0,5X (Tris 0,05 M, EDTA 1,25 mM e ácido bórico 0,05 M).

Os fragmentos obtidos pela digestão com a enzima *Sma*I foram separados por PFGE no equipamento CHEF DR III (Bio Rad). A eletroforese foi realizada com os seguintes parâmetros: tempo de pulso crescente de 2 a 35 segundos por 21 horas a 6 V/cm na temperatura de 13 °C. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta. Um marcador padrão foi utilizado para a observação do tamanho dos fragmentos obtidos (50-1.000 Kb Pulse-Marker, Sigma).

Inicialmente, a análise dos resultados foi realizada visualmente seguindo os critérios recomendados por Tenover e colaboradores (1995). As amostras com o mesmo perfil de bandas foram designadas como um mesmo tipo, com diferenças de bandas de uma a três como proximamente relacionadas, com diferenças de bandas de quatro a seis como possivelmente relacionadas e com diferenças de bandas de sete

ou mais como diferentes tipos. Posteriormente, foi realizada a análise computadorizada, utilizando-se o programa "Gel Compar II" (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os cálculos da matriz de similaridade dos perfis encontrados foram realizados pelo coeficiente de Dice e o dendrograma gerado pelo método de "Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages" (UPGMA).

VIII. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos estudados foram avaliadas usando o teste do X^2 de Yates ou o teste exato de Fisher bicaudal para o cálculo do valor de p. Estas análises bivariadas foram empregadas utilizando o programa EpiInfo versão 3.3.2 (fevereiro de 2005) para identificar os fatores de risco associados à colonização por *S. aureus* sensível ou resistente à metilina.

IX. RECURSOS

O estudo envolveu a presença de um membro entrevistador, o qual, após explicar todo o projeto, entregou ao estudante o termo de consentimento livre e esclarecido e, após a concordância e assinatura por parte do estudante, realizou a entrevista (questionário, anexo II). Após a entrevista outro membro realizou a coleta do espécime clínico.

O material de consumo para realização do estudo foi fornecido através do projeto universal do CNPq concedido à Prof.^a Angela Castro e

através de sua cota na participação do projeto MCT/PRONEX implantado no Instituto de Microbiologia.

X. ASPECTOS ÉTICOS

Apenas os estudantes que assinaram o termo de compromisso livre e esclarecido foram incluídos no estudo. A participação ou não no estudo não acarretou em nenhum benefício ou prejuízo para os estudantes. O nome do estudante constou apenas nos termos de consentimento, os quais foram mantidos em sigilo. No banco de dados e no questionário, os estudantes foram apenas identificados por códigos, resguardando-se sua identidade pessoal.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ, com o número 073/05-CEP.

I. ESPÉCIMES CLÍNICOS

Foram coletados 301 espécimes clínicos nasais de estudantes de graduação em Enfermagem e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tais estudantes responderam a um questionário, visando a obtenção de informações epidemiológicas para a pesquisa, e foram submetidos à coleta através da utilização de um “swab” nasal.

Os estudantes que participaram da pesquisa pertenciam a dois grupos distintos: um grupo que ainda não havia tido contato acadêmico com o ambiente hospitalar (primeiros períodos do curso), e outro grupo que já tinha prática em hospitais (último período). Foram obtidos 201 espécimes clínicos de estudantes do primeiro grupo e 100 de estudantes do segundo grupo.

Foi montado um banco de dados no programa EpiInfo 3.2.2., baseado no questionário respondido pelos estudantes avaliados.

II. ISOLAMENTO DE *S. aureus*

S. aureus foi isolado de 118 (39,2%) dos 301 espécimes clínicos totais (Fig. 1). Entre os estudantes pertencentes ao primeiro grupo de estudantes foram obtidas 85 amostras (42,3%) de *S. aureus* dentre os 201 espécimes isolados (Fig. 2). No segundo grupo, *S. aureus* foi isolado de 33 dos 100 espécimes clínicos analisados (33%), como mostra a figura 3. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre a colonização por *S. aureus* nos dois grupos de estudantes avaliados ($p > 0,05$). Da mesma maneira os valores de p

foram sempre maiores que 0,05 quando se relacionou a presença de *S. aureus* aos seguintes parâmetros: sexo, raça, contato com paciente hospitalizado, hospitalização prévia e convivência com animais domésticos. No entanto, obtiveram-se valores de p menores que 0,05 quando se relacionou a presença de *S. aureus* à utilização recente de antibióticos e trabalho ou estágio em hospitais (Tabela 1). Não foi observada nenhuma relação existente entre colonização por MRSA e os seguintes parâmetros: sexo, raça, uso de antibiótico nos últimos seis meses, contato com paciente hospitalizado, hospitalização prévia, trabalho ou estágio em hospital e convivência com animais domésticos (Tabela 2).

III. UTILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS NA PESQUISA

A partir de cada estudante voluntário ao estudo, foi obtido um único **espécime clínico**. Este foi semeado em placa contendo manitol-salgado, de onde cinco **colônias** suspeitas de *S. aureus* (com características morfológicas semelhantes) foram isoladas e repicadas em placas contendo meio TSA, para se seguirem os testes de identificação. Cada espécime clínico que originou colônias positivas para *S. aureus* foi chamado de **amostra**.

Nem sempre foi possível isolar cinco colônias semelhantes, suspeitas, da mesma amostra. Por outro lado, em alguns casos, foram isoladas até 15 colônias de uma única amostra, já que esta apresentava três tipos de colônias suspeitas com características morfológicas distintas.

Por este motivo, foi isolado um total de 675 colônias das 118 amostras de *S. aureus* obtidas dos estudantes.

IV. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

IV. 1. Teste de difusão em ágar

Todas as 675 colônias, isoladas dos 118 espécimes clínicos obtidos de estudantes colonizados por *S. aureus*, foram submetidas ao teste de disco-difusão para os antibióticos recomendados pelo manual do CLSI (2006) e foram encontrados 17 diferentes perfis de sensibilidade (Tabela 3). Cada colônia analisada apresentou-se sensível à maioria dos antibióticos testados.

Entre as 675 colônias submetidas ao teste de disco-difusão, 15,7% apresentaram-se sensíveis a todos os agentes antimicrobianos testados. O antimicrobiano para o qual foi obtido o maior índice de resistência foi a penicilina: 74,6% das colônias. Também foi verificada resistência às seguintes drogas: eritromicina (21,2%), tetraciclina (10,2%), gentamicina (3,7%), clindamicina (2,7%), cefoxitina (2,4%), oxacilina (2,4%), trimetoprim (1,8%), sulfazotrim (0,9%) e clorafenicol (0,1%). Todas as colônias foram sensíveis aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacin, rifampicina, vancomicina e linezolida (Fig. 4).

Entre as 494 colônias provenientes de amostras de estudantes dos primeiros períodos do curso (sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar), o antimicrobiano para o qual a maioria apresentou resistência foi a penicilina (73,9%), seguido pela eritromicina (19,8%) e pela tetraciclina (9,3%). Foi, ainda, verificada resistência às seguintes drogas: cefoxitina (2,3%), oxacilina (2,3%), gentamicina (1,8%), trimetoprim (1,4%), sulfazotrim (1,2%), clindamicina (0,2%) e clorafenicol (0,2%). Todas as colônias deste primeiro grupo de estudantes foram sensíveis aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacin, rifampicina, vancomicina e linezolida (Fig. 5).

Dentre as 181 colônias obtidas de amostras de estudantes do último período do curso, 79% apresentaram resistência à penicilina. Foi observada resistência a outros antimicrobianos também: eritromicina (25,4%), tetraciclina (11%), clindamicina (9,4%), cefoxitina (2,8%) e oxacilina (2,8%). Não houve resistência aos seguintes antimicrobianos: gentamicina, trimetoprim, sulfazotrim, clorafenicol, ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina, rifampicina, vancomicina e linezolida (Fig. 6).

Utilizando-se uma única colônia isolada de cada amostra, as porcentagens referentes a cada grupo seriam semelhantes às da análise de todas as colônias. No entanto, foram observadas 11 amostras (9,3%) que continham colônias com perfis de susceptibilidade diferentes.

As colônias representantes escolhidas foram as primeiras a serem isoladas a partir do espécime clínico com colônias suspeitas. Entre as 118 amostras, verificaram-se taxas de resistência aos seguintes agentes antimicrobianos: penicilina (76,3%), eritromicina (21,2%), tetraciclina (11,9%), cefoxitina (3,4%), oxacilina (3,4%), clindamicina (2,5%), trimetoprim (2,5%), gentamicina (1,7%), sulfazotrim (1,7%) e clorafenicol (0,9%). Não houve nenhuma amostra resistente aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina, rifampicina, vancomicina e linezolida (Fig. 7).

Dentre as 85 amostras dos estudantes sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar, as taxas de resistência foram as seguintes: penicilina (75,3%), eritromicina (18,8%), tetraciclina (12,9%), trimetoprim (3,6%), cefoxitina (3,5%), oxacilina (3,5%), gentamicina (2,3%), sulfazotrim (2,3%) e clorafenicol (1,2%). Nenhuma amostra apresentou resistência às seguintes drogas: clindamicina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina, rifampicina, vancomicina e linezolida (Fig. 8).

Entre as 33 amostras obtidas de estudantes com contato acadêmico com o ambiente hospitalar, houve resistência aos seguintes antimicrobianos: penicilina (78,8%), eritromicina (27,3%), clindamicina (9,1%), tetraciclina (6,1%), cefoxitina (3%) e oxacilina (3%). As amostras deste grupo foram sensíveis às seguintes drogas: ciprofloxacina, clorafenicol, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacina, rifampicina, sulfazotrim, trimetoprim, vancomicina e linezolida (Fig. 9).

Entre as colônias resistentes à eritromicina, foram encontradas 87, originárias de 12 amostras, com fenótipo MLS_B **indutivo**, e 18, de quatro amostras, com fenótipo MLS_B **constitutivo**.

IV. 2. Teste de triagem para resistência à oxacilina

Todas as colônias de *S. aureus* foram submetidas ao teste de triagem para oxacilina, a fim de se confirmar, fenotipicamente, a sensibilidade/ resistência a este antimicrobiano. Dentre as 675 colônias, 16 apresentaram algum tipo de crescimento em placa de agar Mueller-Hinton, adicionada de NaCl a 4% e 6 µg/mL de oxacilina, indicando resistência. Tais colônias foram as mesmas que apresentaram resistência à oxacilina e à cefoxitina quando submetidas ao teste de disco-difusão.

As 16 colônias resistentes à oxacilina correspondem a quatro amostras dentre as 118 obtidas para este estudo. Destas, três são oriundas de estudantes sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar e, uma de estudantes com contato. Em uma dessas amostras só foi possível obter uma única colônia a partir da placa original. Nas outras foram utilizadas as cinco colônias para a pesquisa.

V. DETECÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À METICILINA (*mecA*) E CARACTERIZAÇÃO DO CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* (*SCCmec*)

Foi realizado multiplex-PCR para as 16 colônias que apresentaram resistência à oxacilina, no teste de disco-difusão de antibióticos e na triagem, a fim de se detectar o gene *mecA* e caracterizar o *SCCmec*.

Todas as colônias apresentaram o gene *mecA*, o que as confirma como sendo MRSA, e *SCCmec* do tipo IVa (Fig. 10).

VI. DETECÇÃO DOS GENES PARA LEUCOCIDINA PANTON-VALENTINE (*lukS-PV-lukF-PV*)

A PCR para a detecção dos genes *lukS-PV-lukF-PV* foi realizada utilizando-se as 16 colônias de MRSA. Nenhuma delas apresentou o determinante genético para esta toxina.

VII. ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO (PFGE)

Todas as colônias de MRSA foram submetidas à análise pelo PFGE (Fig. 11). O dendrograma gerado (Fig. 12) aponta 100% de similaridade entre as colônias de MRSA obtidas de uma mesma amostra. Observa-se, também, que existe elevada proximidade genética entre amostras obtidas de diferentes estudantes colonizados por MRSA: 68% de similaridade entre as colônias da única amostra de MRSA obtida de estudante do último período (que tinha contato acadêmico com o

ambiente hospitalar) e as colônias obtidas dos estudantes dos primeiros períodos (que não tinham contato). A similaridade entre as amostras de estudantes sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar foi ainda mais alta, ultrapassando 70%. A partir de análise visual das bandas geradas entre amostras desses estudantes, observa-se diferença de 2 ou 3 bandas. Entre as amostras destes estudantes e do estudante com contato acadêmico com o ambiente hospitalar, foi verificada diferença de 7 bandas.

Em uma determinada amostra contendo, predominantemente, colônias de MRSA, também foi encontrada uma colônia de MSSA. O dendrograma gerado a partir da similaridade entre estas colônias (Fig. 13) apresentou 96,4% de proximidade genética entre a colônia MSSA e as de MRSA. A diferença visual dos dois perfis está apenas em uma banda.

Entre as amostras de MSSA, apenas uma colônia representante de cada foi submetida à análise pelo PFGE. Esta colônia representante é a mesma utilizada na pesquisa de susceptibilidade a antimicrobianos com apenas uma colônia de cada amostra. Foi gerado um dendrograma geral, incluindo os perfis de bandas obtidos destas colônias de MSSA e uma colônia representante de cada amostra de MRSA (Fig. 14). Foi observada uma elevada diversidade genética entre as amostras obtidas neste estudo. Uma amostra de MRSA (118B₁) apresentou 100% de similaridade com outras de MSSA (26A₁ e 78B₁).

Tabela 1 – Análise bivariada das variáveis relacionadas à aquisição de *S. aureus* por estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ.

Variável	Estudantes: N (%)		OR (IC95%)	p
	Colonizados (n =118)	Não colonizados (n =183)		
Gênero (fem)	100 (84,7)	166 (90,7)	0,57 (0,27-1,22)	0,16
Etnia branca	64 (54,2)	109 (59,6)	0,82 (0,50-1,35)	0,48
Etnia p/m* e negra	48 (40,7)	66 (36,1)	1,22 (0,73-2,01)	0,49
Uso de antibiótico (6 meses)	32 (27,1)	75 (41)	0,54 (0,31-0,91)	0,02
Uso de corticóide (6 meses)	13 (11)	19 (10,4)	0,65 (0,28-1,46)	0,34
Trabalho ou estágio em hospital (6 meses)	39 (33,1)	85 (46,4)	0,57 (0,34-0,95)	0,03
Hospitalização prévia	10 (8,5)	13 (7,1)	1,21 (0,47-3,07)	0,83
Contato com paciente hospitalizado	62 (52,5)	107 (58,5)	0,79 (0,48-1,29)	0,37
Contato domiciliar com animais	77 (65,2)	122 (66,6)	0,94 (0,56-1,58)	0,90

* Etnia p/m: etnia parda ou morena

OR: "Odds Ratio" ou razão de possibilidades

IC: Intervalo de confiança

Tabela 2 – Análise bivariada das variáveis relacionadas à aquisição de MRSA por estudantes universitários

Variável	Estudantes: N (%)		OR (IC95%)	p
	Colonizados (n =4)	Não colonizados (n =297)		
Gênero (fem)	4	262	indefinido	1
Etnia branca	2	171	0,74 (0,07-7,42)	1
Etnia p/m* e negra	2	112	1,65 (0,16-16,65)	0,63
Uso de antibiótico (6 meses)	0	107	0,00 (0,00-2,78)	0,30
Uso de corticóide (6 meses)	0	32	0,00 (0,00-13,38)	1
Trabalho ou estágio em hospital (6 meses)	2	122	1,43 (0,14-14,45)	1
Hospitalização prévia	0	22	0,00 (0,00-20,69)	1
Contato com paciente hospitalizado	4	165	indefinido	0,13
Contato domiciliar com animais	3	196	1,55 (0,14-39,06)	1

* Etnia p/m: etnia parda ou morena

OR: "Odds Ratio" ou razão de possibilidades

IC: Intervalo de confiança

Tabela 3 – Perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos entre as 675 colônias de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ.

<i>Antibióticos</i>	<i>% de colônias de S. aureus resistentes aos antimicrobianos</i>		
	<i>Grupo 1 (a)</i>	<i>Grupo 2 (b)</i>	<i>Total (c)</i>
PEN	55,5	53,6	55
ERI	8,7	5,5	7,8
PEN e ERI	5,9	4,4	5,5
PEN, ERI e TET	4	5,5	4,4
PEN e TET	2,4	5,5	3,3
PEN, ERI e CLI	0	7,9	1,9
PEN, OXA e CEF	1,2	2,8	1,6
PEN, OXA, CEF e ERI	1	0	0,7
PEN, TET e GEN	1	0	0,7
PEN, TET, SUT e TRI	1	0	0,7
ERI e CLI	0,2	2,2	0,7
PEN e GEN	0,8	0	0,6
TET e TRI	0,4	0	0,3
PEN, SUT e TRI	0,2	0	0,1
TET	0,2	0	0,1
PEN, TET e CLO	0,2	0	0,1
Sensíveis a todos	16,6	13,3	15,7

a – Estudantes sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

b – Estudantes com contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

c – Estudantes com e sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

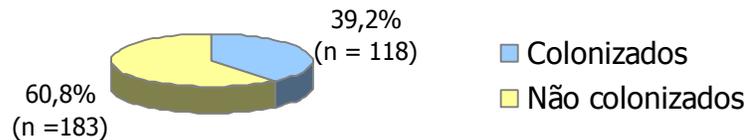


Figura 1 – Prevalência de *S. aureus* em estudantes universitários do curso de Enfermagem da UFRJ (junho de 2005 a novembro de 2006).

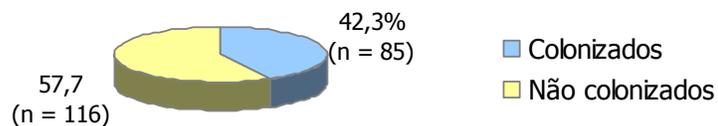


Figura 2 – Prevalência de *S. aureus* em estudantes dos primeiros períodos do curso de Enfermagem da UFRJ (sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar).

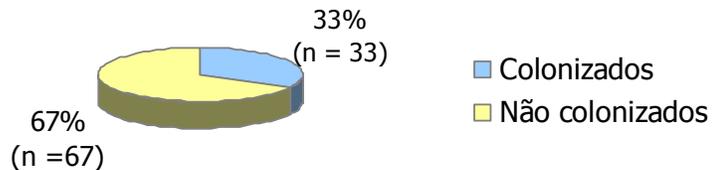


Figura 3 – Prevalência de *S. aureus* em estudantes do último período do curso de Enfermagem da UFRJ (com contato acadêmico com o ambiente hospitalar).

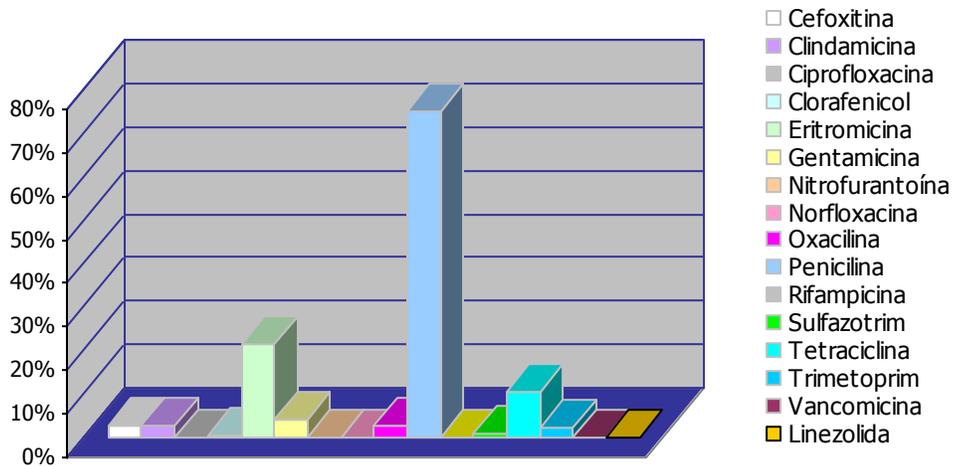


Figura 4 – Percentagem de resistência aos antimicrobianos entre as 675 colônias de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ (junho de 2005 a novembro de 2006).

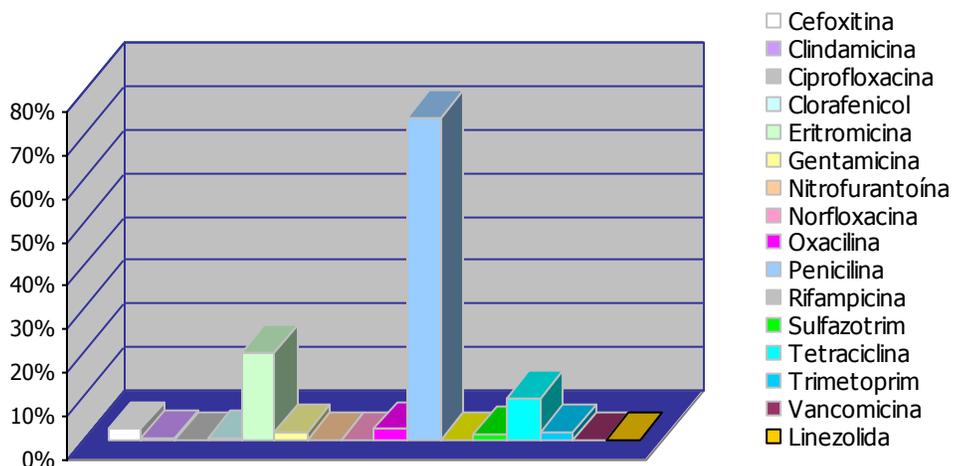


Figura 5 – Percentagem de resistência aos antimicrobianos entre as 494 colônias de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ, sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

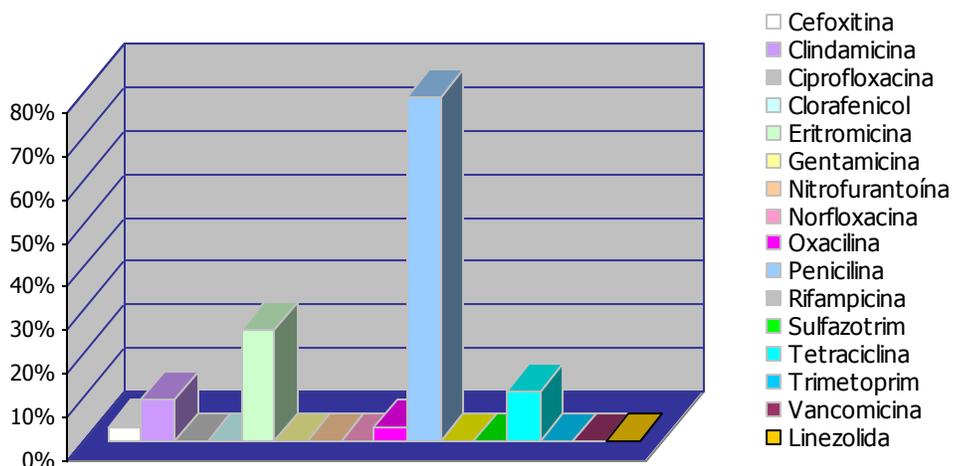


Figura 6 – Percentagem de resistência aos antimicrobianos entre as 181 colônias de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ, com contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

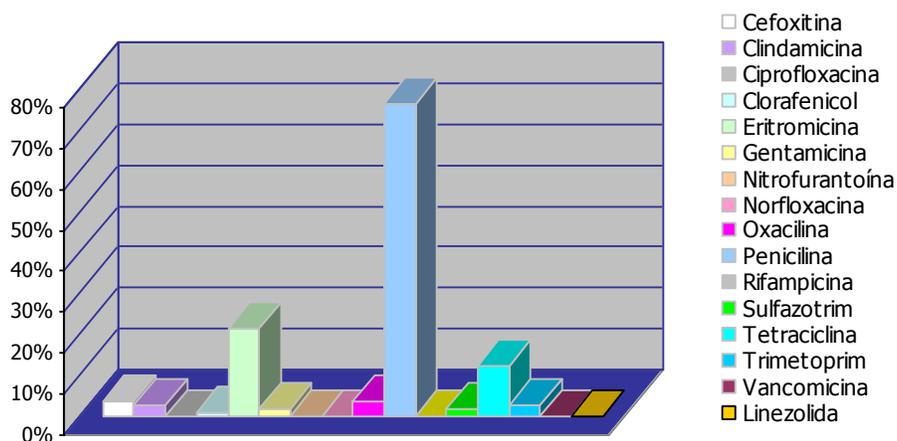


Figura 7 – Percentagem de resistência aos antimicrobianos entre as 118 amostras de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ, com e sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

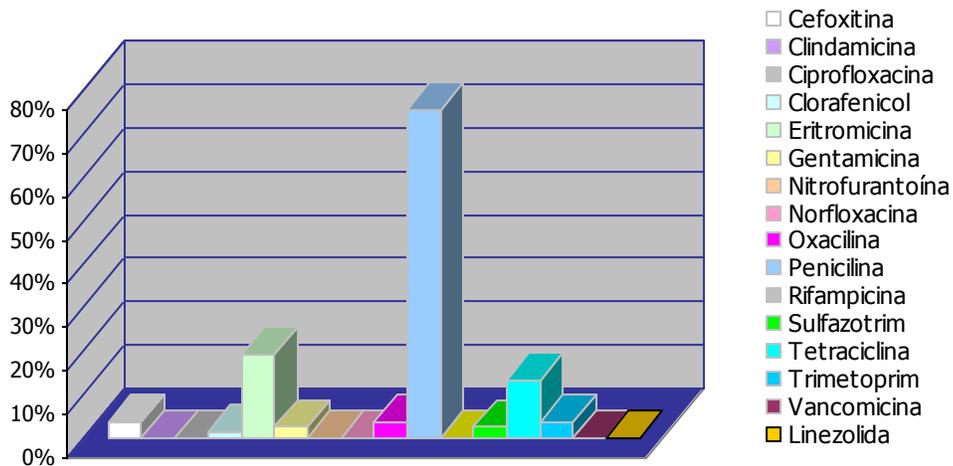


Figura 8 – Percentagem de resistência aos antimicrobianos entre as 85 amostras de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ, sem contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

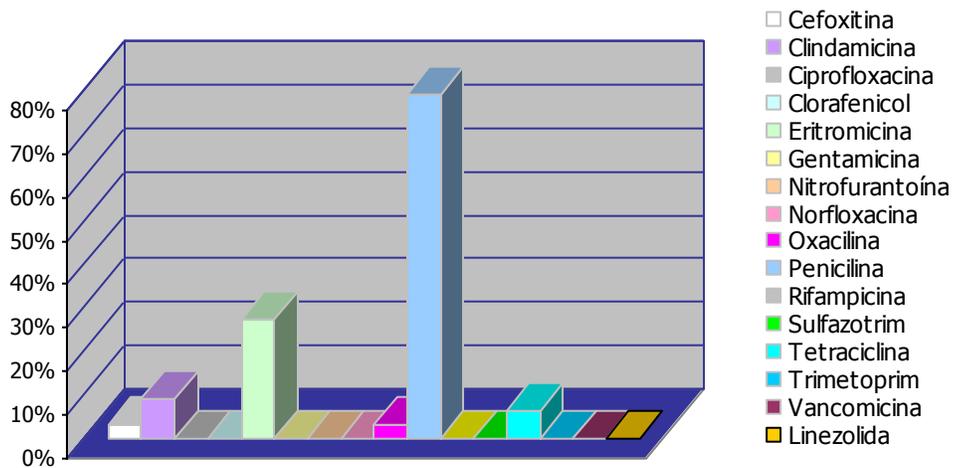


Figura 9 – Percentagem de resistência aos antimicrobianos entre as 33 amostras de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ, com contato acadêmico com o ambiente hospitalar.

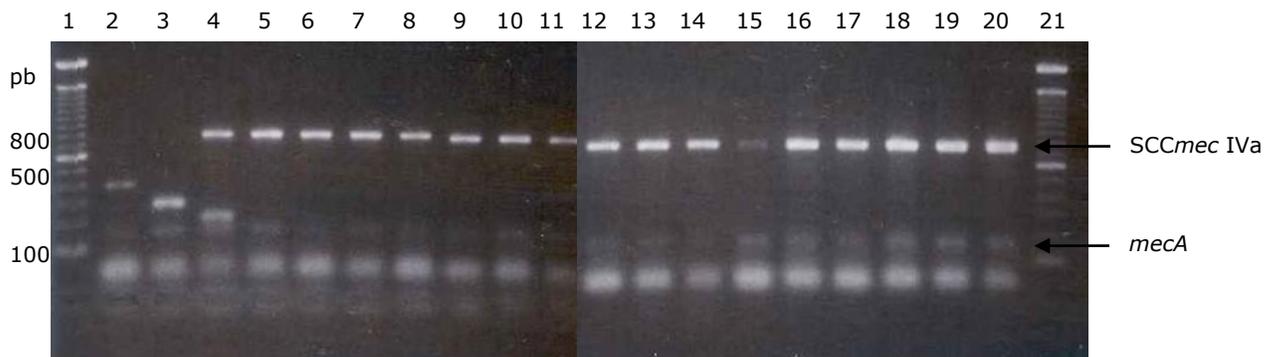


Figura 10 – Multiplex-PCR de 16 colônias de *S. aureus* resistentes à oxacilina, isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ, para verificação da presença do gene *mecA* e classificação do elemento *SCCmec* presente nestas colônias. 1: padrão de tamanho de fragmento (100kb). 2, 3 e 4: amostras-controle da reação, apresentando gene *mecA* e *SCCmec* tipo II (USA100), *SCCmec* tipo III (HU25) e *SCCmec* tipo IVa (WB45), respectivamente. 5 ao 9: 5 colônias da 1ª amostra resistente obtida no estudo. 10 ao 14: 5 colônias da 2ª amostra resistente obtida. 15: colônia da 3ª amostra resistente obtida. 16 ao 20: 5 colônias da 4ª amostra resistente obtida. 21: padrão de tamanho de fragmento (100kb).

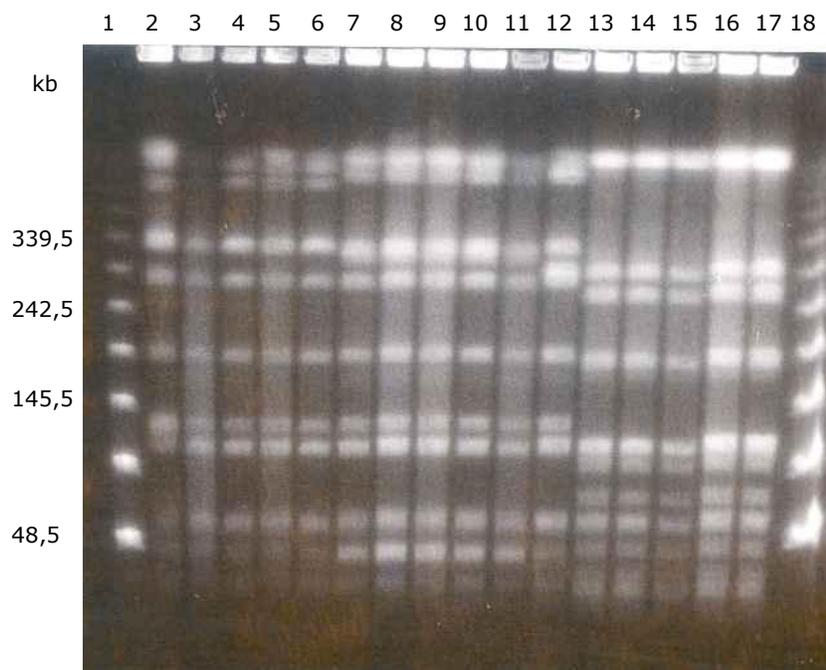


Figura 11 – PFGE de 16 colônias de MRSA isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ. 1: padrão de tamanho de fragmento. 2 ao 6: 5 colônias da 1ª amostra resistente obtida no estudo. 7 ao 11: 5 colônias da 2ª amostra resistente obtida. 12: colônia da 3ª amostra resistente obtida. 13 ao 17: 5 colônias da 4ª amostra resistente obtida. 18: padrão de tamanho de fragmento.

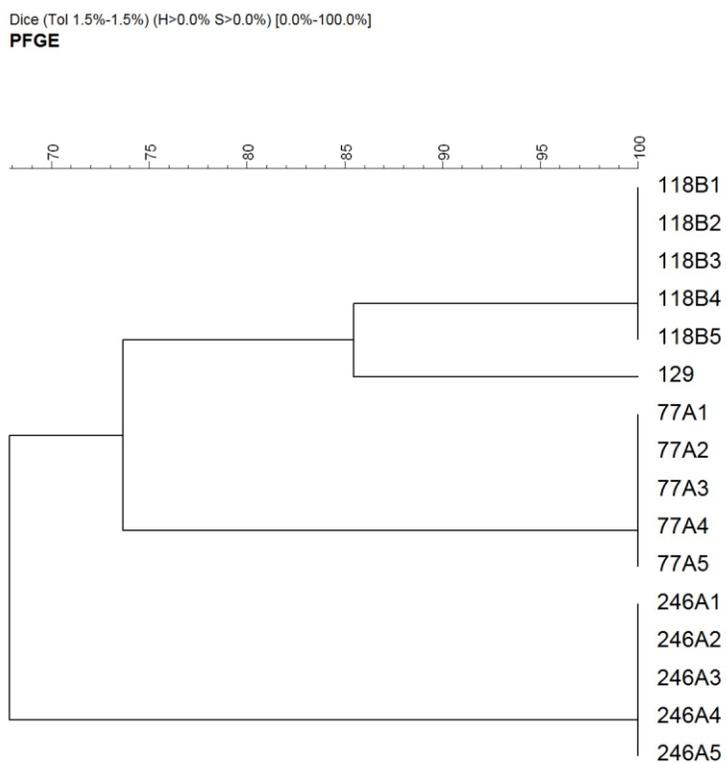


Figura 12 – Dendrograma gerado a partir de análise computadorizada dos perfis de PFGE das colônias de MRSA isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ. Coeficiente de Dice e uma tolerância de 1,5% foram utilizadas para os cálculos de similaridade entre os perfis.

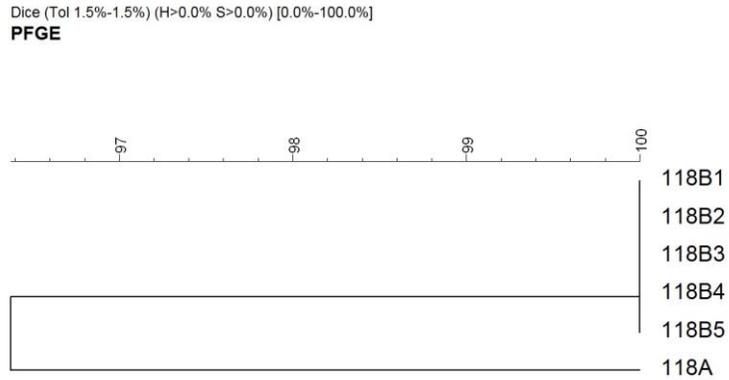


Figura 13 – Dendrograma gerado a partir de análise computadorizada dos perfis de PFGE das colônias de MRSA e MSSA, obtidas a partir de uma amostra isolada de estudante do curso de Enfermagem da UFRJ. Coeficiente de Dice e uma tolerância de 1,5% foram utilizadas para os cálculos de similaridade entre os perfis.

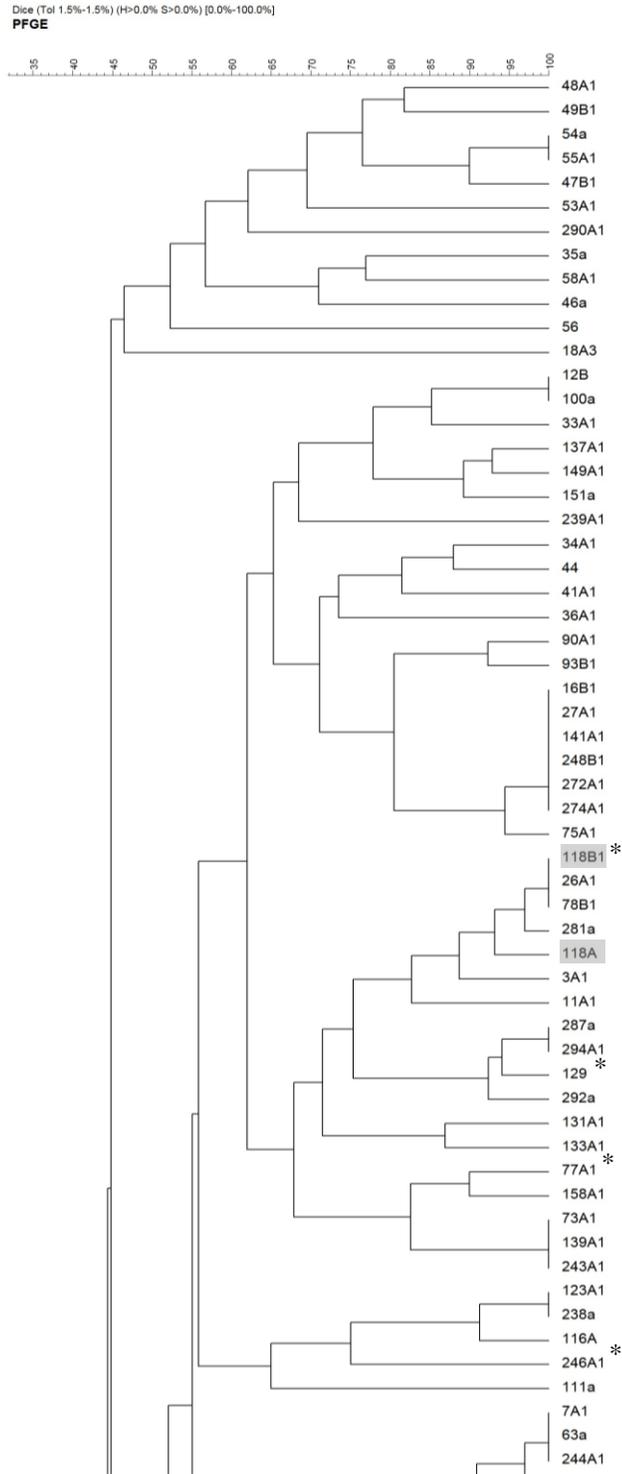
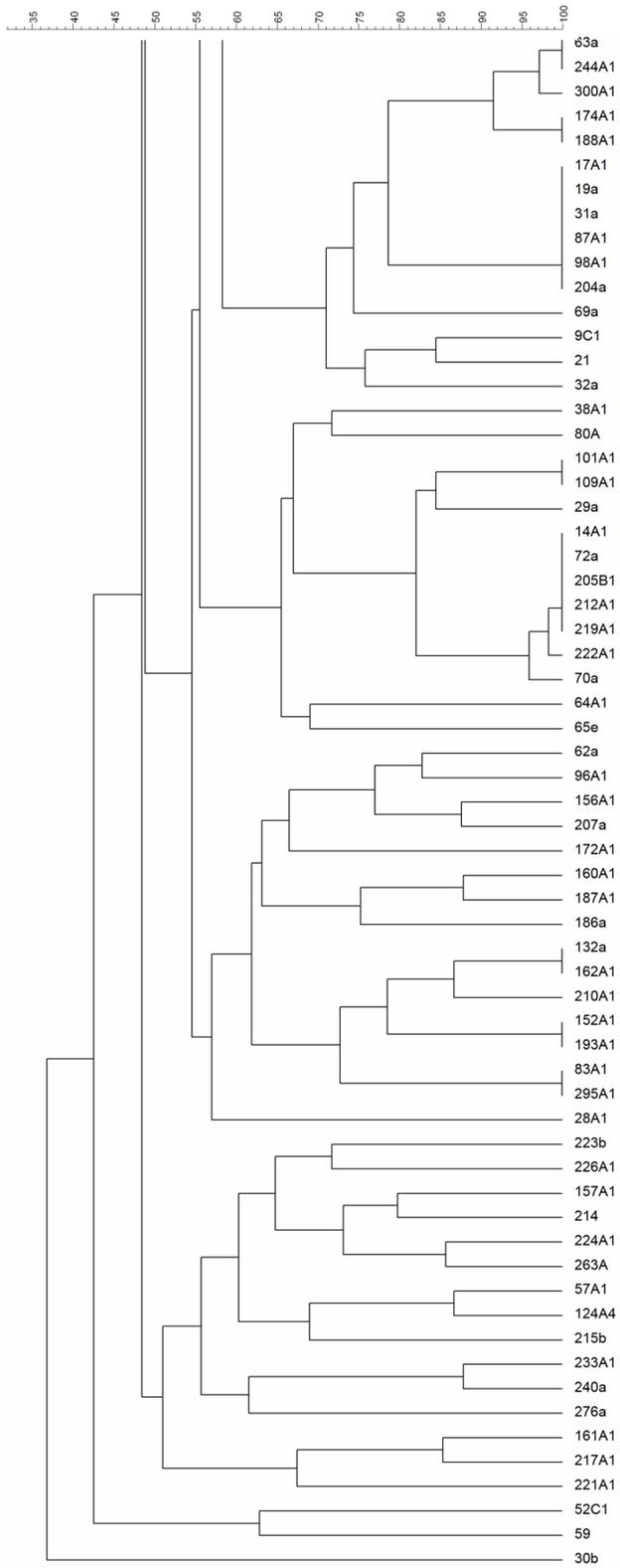


Figura 14 – Dendrograma gerado a partir de análise computadorizada dos perfis de PFGE de 118 amostras de *S. aureus* isoladas de estudantes do curso de Enfermagem da UFRJ. Coeficiente de Dice e uma tolerância de 1,5% foram utilizadas para os cálculos de similaridade entre os perfis. MRSA destacadas com asterisco (*). Em cinza, colônias provenientes da mesma amostra.

Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE



S. aureus é um conhecido patógeno de seres humanos, principalmente no ambiente hospitalar, onde é responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade (WEIDENMAIER *et al.*, 2004).

Cepas resistentes à meticilina (MRSA) emergiram e se disseminaram por hospitais de várias partes do mundo e, atualmente, representam entre 28 a 37,8% das amostras isoladas de infecções hospitalares por *S. aureus* no Brasil (SADER *et al.*, 2004; BRITES, SILVA & SAMPAIO-SA, 2006).

Apesar da sigla MRSA estar historicamente associada a infecções hospitalares, desde a década de 1980 vêm sendo cada vez mais freqüentes os relatos de infecções por MRSA em indivíduos sadios, sem risco aparente (EADY & COVE, 2003). Até bem pouco tempo, acreditava-se que certos clones de MRSA (os que contêm *SCCmec* dos tipos I-III) estavam restritos ao meio hospitalar enquanto que, outros (*SCCmec* tipo IV-VI) só se estabeleciam na comunidade, longe da pressão seletiva de antimicrobianos que o ambiente hospitalar impõe. Algo vem mudando a este respeito, uma vez que cepas do clone Pediátrico (*SCCmec* tipo IV) têm sido cada vez mais descritas em hospitais de diversas partes do mundo (SÁ-LEÃO *et al.*, 1999; McDougal *et al.*, 2003; HALLIN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2008).

O presente estudo utilizou espécimes clínicos coletados de estudantes do curso de Enfermagem e Obstetrícia da UFRJ para verificar a taxa de colonização por *S. aureus*.

Os estudantes foram divididos em dois grupos. O primeiro compreendia estudantes dos três primeiros períodos do curso, que ainda não tinham contato hospitalar na vida acadêmica. O segundo grupo foi

composto por alunos do último período da graduação, que já atuavam em hospitais.

Verificou-se que a taxa de colonização por *S. aureus* em ambos os grupos foi de 39,2%. No primeiro grupo foi encontrada uma taxa de 42,3% e no segundo, de 33%. Estes valores estão na faixa dos que têm sido descritos na literatura, onde a maioria dos estudos relata uma taxa de colonização de 18-38% (KENER *et al.*, 2003; ELLIS *et al.*, 2004; WEIDENMAIER *et al.*, 2004; CREECH II *et al.*, 2005; HIDRON *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2005; PANHOTRA, SAXENA & MULHIM, 2005; SANTACOLOMA *et al.*, 2007). É interessante ressaltar que a taxa de colonização não se mostrou mais elevada entre os estudantes em contato permanente com o ambiente hospitalar. A porcentagem de colonização encontrada sugere que outros fatores, que não os avaliados neste estudo, sejam responsáveis pela aquisição de *S. aureus* pela comunidade estudada.

Pesquisou-se a susceptibilidade aos antimicrobianos entre todas as colônias obtidas das amostras de *S. aureus* (675 no total de 118 amostras) e foi observada uma alta taxa de resistência à penicilina (74,6%) e à eritromicina (21,2%), assim como uma taxa razoável de resistência à tetraciclina (10,2%). Baixos níveis de resistência foram observados para os seguintes antimicrobianos: gentamicina, clindamicina, cefoxitina, oxacilina, trimetoprim, sulfazotrim e clorafenicol. Não foi verificada resistência aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina, rifampicina, vancomicina e linezolida. Estes dados condizem com dados publicados na literatura. As amostras obtidas são de indivíduos da comunidade, onde existe menor pressão de antibióticos selecionando bactérias mais resistentes. Choi e colaboradores (2006) detectaram alta taxa de resistência à penicilina (82,7%) entre amostras de *S. aureus* obtidas de colonização nasal de estudantes de medicina, médicos e

visitantes da clínica universitária de uma universidade na Malásia. Em algumas regiões, a taxa de resistência à eritromicina é elevada, refletindo a frequência que médicos prescrevem macrolídeos, em especial, a eritromicina, quando existe suspeita de que o paciente seja alérgico à penicilina (EADY & COVE, 2003).

Foram encontradas colônias apresentando os fenótipos MLS_B **indutivo** e **constitutivo**. O primeiro está relacionado com a resistência a macrolídeos, lincosamídeos e estreptograminas B, na presença de um macrolídeo indutor. O segundo é a resistência constante a antibióticos pertencentes a estas três classes. Esta identificação é importante para o tratamento utilizado no paciente. Se *in vitro*, a amostra se apresentar resistente à eritromicina, a clindamicina (um lincosamídeo) é a terapêutica recomendada. No entanto, já foi demonstrado que amostras MLS_B indutivas passaram a apresentar fenótipo constitutivo durante o tratamento *in vivo* (O'BRIEN *et al.*, 2005).

Analisando-se cada grupo de estudantes separadamente, observou-se que as taxas de resistência aos antimicrobianos não variaram muito em relação aos dados observados na análise total: as altas taxas de resistência à penicilina e à eritromicina, e a taxa razoável de resistência à tetraciclina se refletiram em ambos os grupos de estudantes. A maior diferença entre os dois grupos foi a taxa razoável de resistência à clindamicina (9,4%) observada em colônias obtidas de amostra de estudantes dos últimos períodos.

Fato curioso foi que, enquanto 10 drogas apresentaram atividade inibitória contra todas as colônias isoladas de amostras de estudantes do último período, apenas seis se mostraram eficientes contra 100% das colônias isoladas de amostras de estudantes dos primeiros períodos do curso. Este resultado foi inesperado já que os estudantes do último período (8º) vêm tendo contato com o ambiente hospitalar desde o 4º período.

Dentre as 675 colônias analisadas no estudo, 16 (2,4%) apresentaram resistência à oxacilina, tanto no teste de disco-difusão, quanto no teste de triagem. Estas colônias foram isoladas de quatro amostras. Ou seja, quatro estudantes (3,4%) dentre os 118 colonizados por *S. aureus*, apresentavam cepas resistentes à meticilina colonizando suas narinas no momento da coleta. Dentre estes indivíduos, três ainda cursavam o primeiro ou o segundo período do curso de Enfermagem e um cursava o último período. A taxa de colonização por MRSA encontrada neste estudo foi baixa e compatível com dados existentes na literatura (KENER *et al.*, 2003; CREECH II *et al.*, 2005; HIDRON *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2005; PANHOTRA, SAXENA & MULHIM, 2005; SANTACOLOMA *et al.*, 2007).

As colônias obtidas a partir das amostras de tais estudantes foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados, perfis típicos de amostras MRSA comunitárias. Apenas cinco colônias de uma mesma amostra (de estudante do 2º período) apresentaram resistência à eritromicina. As colônias obtidas de amostras dos outros três estudantes apresentaram perfil de multissensibilidade.

Analisando-se o questionário com informações epidemiológicas desses participantes, observou-se que os três estudantes do primeiro grupo haviam tido algum tipo de contato com o ambiente hospitalar: um atuava como auxiliar de enfermagem havia cinco anos, e os outros dois haviam feito visita a paciente internado havia menos de seis meses.

Através da PCR, observou-se que os quatro estudantes estavam colonizados por cepas de MRSA que carregavam SCCmec tipo IVa, sendo PVL-negativas. Cepas como estas têm sido encontradas tanto na comunidade como em hospitais de outras partes do mundo (KIM *et al.*, 2007; LAPLANA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2007).

No primeiro caso, apesar de a amostra isolada ter perfil de resistência característico de MRSA comunitário, o estudante pode ter

sido colonizado em hospital, uma vez que se observa um predomínio de clones, anteriormente tidos como comunitários, entre hospitais de diversas partes do mundo. Por acaso, a amostra deste estudante carregava o mesmo *SCCmec* de tais clones (SÁ-LEÃO *et al.*, 1999; MCDUGAL *et al.*, 2003; HALLIN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2008).

Pelo mesmo motivo é difícil afirmar que o estudante do último período, colonizado por MRSA, tenha adquirido esta cepa em sua rotina hospitalar. O estudante pode ter sido colonizado na comunidade. A cepa encontrada colonizando suas narinas também apresentava perfil fenotípico (sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados) e genotípico (*SCCmec* tipo IVa) de amostras de MRSA até pouco tempo reconhecidas como comunitárias.

Os outros dois estudantes dos primeiros períodos, colonizados por MRSA, também haviam tido algum contato com hospitais. Eles estiveram em contato com pacientes hospitalizados através de visitas rápidas e em um curto período de tempo. Apesar das cepas encontradas em suas narinas possuírem um perfil relacionado a amostras comunitárias, o ambiente hospitalar, neste caso, não está isento de ter sido a fonte de colonização.

As amostras de MRSA encontradas apresentaram *SCCmec* característico de amostras comunitárias (tipo IV) mas não apresentaram genes para a PVL. No entanto, tem sido muito freqüente o isolamento de MRSA com *SCCmec* tipo IV, carregando os genes para a PVL de infecções de pele ou mesmo de pneumonias. Esta combinação é tão comum que alguns pesquisadores chegaram a propor que *SCCmec* tipo IV e PVL fossem marcadores de cepas de CA-MRSA (VANDENESCH *et al.*, 2003). No entanto, esta proposta não é de aceitação geral uma vez que existem cepas de MRSA que não apresentam genes codificadores da leucotoxina, como as isoladas neste estudo, obtidas de colonização em indivíduos sem quaisquer problemas de saúde.

Os percentuais de resistência aos antimicrobianos variaram muito pouco quando foi analisada apenas uma única colônia representante de cada amostra. A grande maioria dos estudos de epidemiologia envolvendo colonização por *S. aureus* utiliza apenas uma colônia por amostra na pesquisa, e é com o termo **amostra** que se refere a cada **colônia** analisada (CHOI *et al.*, 2006). Entretanto, isto talvez gere distorções a respeito do que se tenha em mãos. O estudo de uma única colônia pode fornecer perfil de susceptibilidade a antimicrobianos diferente de uma segunda (CESPEDES *et al.*, 2005). Nesta pesquisa foram observadas 11 amostras (9,3%) que continham colônias com perfis de susceptibilidade diferentes, sugerindo colonização por mais de uma cepa de *S. aureus*. A diferença entre tais perfis de susceptibilidade não era grande: normalmente relacionada a apenas um antibiótico. No entanto, pode trazer sérias conseqüências na clínica. Em uma destas 11 amostras, por exemplo, havia mais de um tipo de colônia suspeito na placa onde o espécime clínico foi semeado. A primeira colônia repicada para estudo apresentou susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados. As outras cinco colônias isoladas apresentaram resistência à cefoxitina, à eritromicina, à oxacilina e à penicilina, ou seja, tratava-se de colônias de MRSA.

Todas as colônias de MRSA obtidas neste estudo foram submetidas à análise pela técnica de PFGE. Os objetivos eram: comparar colônias isoladas de uma mesma amostra entre si e comparar colônias de amostras diferentes para avaliar a proximidade genética entre elas.

Verificou-se 100% de similaridade entre colônias isoladas de cada amostra de MRSA. A comparação entre colônias de amostras diferentes de MRSA, através do dendrograma gerado apontou grande proximidade genética entre elas (68%). É nítida a distância evolutiva entre as colônias de MRSA obtidas do estudante do último período colonizado e

as dos estudantes iniciantes no curso de Enfermagem. Amostras deste último grupo apresentaram mais de 70% de similaridade entre elas. Dois dos quatro estudantes colonizados por MRSA estudavam na mesma classe, no segundo período do curso de Enfermagem. A similaridade entre as duas amostras foi de mais de 80%, e também pode ser observada na foto do gel, no qual se nota diferença em apenas duas bandas entre as amostras (Fig. 12).

A análise visual das bandas geradas, segundo os parâmetros sugeridos por Tenover e colaboradores (1995), sugere que todas as amostras de MRSA coletadas de estudantes dos primeiros períodos sejam proximamente relacionadas, uma vez que a diferença entre as amostras foi de 2 ou 3 bandas. Esta diferença estaria baseada em um único evento genético que tenha ocorrido, como uma mutação pontual, inserção ou deleção de DNA. Através da mesma comparação, foi observado que as amostras dos estudantes dos primeiros períodos não são relacionadas com a do estudante do último período, uma vez que a diferença entre tais amostras é de 7 bandas.

É importante lembrar que uma amostra de MRSA também apresentou uma colônia de MSSA, a qual não foi incluída no dendrograma. Analisando a proximidade genética entre as colônias de MSSA e MRSA desta mesma amostra, observaram-se 96,4% de similaridade, sugerindo que a colonização nasal por *S. aureus* possa ser policlonal em alguns indivíduos.

Uma colônia representativa de cada amostra de MSSA e de MRSA foi submetida ao PFGE. O dendrograma resultante da análise automatizada incluiu os perfis de bandas obtidos de uma colônia de cada indivíduo colonizado por *S. aureus* participante no estudo. A única exceção foi uma amostra que apresentava colônias de MRSA e MSSA. Esta foi a única amostra que teve duas colônias representantes neste dendrograma geral, devido à particularidade de seu caso.

Apesar da alta heterogeneidade observada entre as amostras, perfis idênticos foram encontrados entre amostras coletadas em épocas distintas, originárias de indivíduos não relacionados e, ainda, com perfis de resistência a antibióticos diferentes. Uma das amostras de MRSA apresentou 100% de similaridade com outras amostras de MSSA. Isto pode indicar que um único clone neste grupo tenha adquirido diferentes genes de resistência, devido a uma pressão seletiva exercida por antibióticos no ambiente onde esta cepa é encontrada (Fig. 14).

Se fossem consideradas similaridades a partir de 80%, a única amostra de MRSA que não pertenceria a um grupo com amostras de MSSA seria aquela coletada da estudante do último período (Fig. 14).

Tal como no presente estudo, Shopsin e colaboradores (2000) observaram alta taxa de colonização por MSSA e baixa taxa por MRSA. Os autores também verificaram grande diversidade genética entre as amostras isoladas. Por sua vez, Santacoloma e colaboradores (2007) observaram diversidade genética abaixo do que esperavam a respeito de colonização nasal por *S. aureus* em indivíduos maiores de 65 anos na província de Segovia, na Espanha. Os autores associaram tal fato à baixa mobilização dos habitantes desta província para outras regiões. Em contrapartida, no presente estudo, foram analisadas amostras obtidas de estudantes oriundos de diferentes partes do estado do Rio de Janeiro. Alguns deles vieram de outros estados, e mesmo, de outros países. Isto pode ser a razão pela qual foi encontrada tamanha diversidade entre as amostras de *S. aureus* isoladas de estudantes universitários.

Em relação aos possíveis fatores de risco, Santacoloma e colaboradores (2007) observaram que não houve associação entre antibioticoterapia prévia e colonização por *S. aureus*. A análise estatística aplicada aos presentes dados não possibilitou a identificação de fatores de risco para colonização por *S. aureus*. No entanto,

antibioticoterapia prévia foi apontada como possível fator de proteção, o que parece uma observação coerente tendo em vista que as amostras obtidas no presente estudo eram de origem comunitária e multissensíveis a antibióticos. Mesmo assim, é importante ressaltar a importância do uso prudente de antibióticos para reduzir o crescente aumento das resistências.

Trabalho em hospitais ou convívio com indivíduos que trabalhem nestes locais também não foi fator de risco para colonização. No entanto, curiosamente, foi apontado como fator de proteção. Estudos posteriores com um maior número de amostras devem ser realizados para esclarecer este dado.

Apesar de já ter sido observada colonização por MRSA em cachorros (LOEFFLER *et al.*, 2005), no presente estudo a convivência com animais não parece ter influenciado, de forma significativa, a colonização de seus donos por *S. aureus*.

Da mesma forma, a convivência com crianças pequenas não pareceu ser um fator de risco no presente estudo, embora alguns autores já tenham descrito altas taxas de colonização por MRSA em crianças (HEROLD *et al.*, 1998; CREECH II *et al.*, 2005; VOURLI *et al.*, 2005).

O número de publicações acerca de infecções, fatores de virulência, resistência a drogas e epidemiologia de *S. aureus* é sempre farto. A importância desses microrganismos em infecções hospitalares e comunitárias do mundo inteiro cresceu ainda mais com o estabelecimento de MRSA em ambos os ambientes, acometendo pessoas com saúde frágil e, também, indivíduos saudáveis. O temor da emergência de cepas resistentes à vancomicina impulsiona a corrida científica em busca de alternativas de drogas capazes de inibir o crescimento dessas bactérias. Pesquisas a respeito de colonização por *S. aureus* sensíveis à metilina na comunidade não são tão comuns,

mas são de grande importância na compreensão da dinâmica de transferência de genes de virulência e de resistência a antibióticos, e na prevenção de infecções estafilocócicas.

CONCLUSÃO

- A taxa de colonização por *S. aureus*, observada no presente estudo, está de acordo com a literatura;
- A elevada diversidade genética observada entre as amostras isoladas de diferentes indivíduos corrobora dados da literatura;
- Foi verificada possibilidade de existência de policlonalidade entre colônias morfológicamente semelhantes, isoladas de um mesmo espécime clínico;
- Sugestão de uso de meios seletivos para se identificar MRSA em laboratórios clínicos, ou pesquisa de mais de uma colônia;
- Percentual colonização por MRSA em indivíduos da comunidade condizentes com a literatura;
- PVL parece estar presente em amostras envolvidas em infecções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=STAPHYLOCOCCUS Acesso em 17 de janeiro de 2008.
- BANNERMAN, T.L. 2003. Gram-positive cocci: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *In: Manual of Clinical Microbiology*. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, Robert H. Tenover (eds.), 8th ed., Washington, D.C., ASM Press, p. 384-404.
- BANNERMAN, T.L., HANCOCK, G.A., TENOVER, F.C., MILLER, J.M. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **33** (3): 551-555.
- BISCHOFF, W.E., WALLIS, M.L., TUCKER, B.K., REBOUSSIN, B.A., PFALLER, M.A., HAYDEN, F.G., SHERERTZ, R.J. 2006. "Gesundheit!" sneezing, common colds, allergies, and *Staphylococcus aureus* dispersion. *J. Infect. Dis.*, **194** (8): 1119-1126.
- BOKAREWA, M.I., JIN, T., TARKOWSKI, A. 2006. *Staphylococcus aureus*: staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**: 504-509.
- BRAKSTAD, O.G. & MAELAND, J.A. 1997. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, **105** (4): 264-276.

- BRITES, C., SILVA, N., SAMPAIO-SA, M. 2006. Temporal evolution of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Bahia, Brazil: a nine-year evaluation study. *Braz. J. Infect. Dis.*, **10** (4): 235-238.

- CARLETON, H.A., DIEP, B.A., CHARLEBOIS, E.D., SENSABAUGH, G.F., PERDREAU-REMINGTON, F. 2004. Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. *J. Infect. Dis.*, **190** (10): 1730-1738.

- CESPEDES, C., SAÏD-SALIM, B., MILLER, M., LO, A.H., KREISWIRTH, B.N., GORDON, R.J., VAVAGIAKIS, P., KLEIN, R. S., LOWY, F.D. 2005. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J. Infect. Dis.*, **191**: 444-452.

- CHAMBERS, H.F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.*, **7** (2): 178-182.

- CHOI, C.S., YIN, C.S., BAKAR, A.A., SAKEWI, Z., NAING, N.N., JAMAL, F., OTHMAN, N. 2006. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. *J. Microbiol. Infect.*, **39**: 458-464.

- CLARKE, S.R., HARRIS, L.G., RICHARDS, R.G., FOSTER, S.J. 2002. Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **70** (12): 6680-6687.

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth Information Supplement. CLSI, **26** (3).

- COUTO, I., DE LENCASTRE, H., SEVERINA, E., KLOOS, W., WEBSTER, J.A., HUBNER, R.J., SANCHES, I.S., TOMASZ, A. 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. Microb. Drugs Resist., **2** (4): 377-391.

- COUTO, I., WU, S.W., THOMASZ, A., DE LENCASTRE, H. 2003. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of *mecA* homologue native to the species. J. Bacteriol., **185** (2): 645-653.

- CREECH II, C.B., KERNODLE, D.S., ALSENTZER, A., WILSON, C., EDWARDS, K.M. 2005. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. Pediatr. Infect. Dis. J., **24**: 617-621.

- DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev., **13** (1): 16-34.

- DOWNER, R., ROCHE, F., PARK, P.W., MECHAM, R.P., FOSTER, T.J. 2002. The elastin binding-protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell-wall associated protein. J. Biol. Chem., **277** (1): 243-250.

- EADY, A.E. & COVE, J.H. 2003. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **16**: 103-124.
- ELLIS, M.W., HOSPENTHAL, D.R., DOOLEY, D.P., GRAY, P.J., MURRAY, C.K. 2004. Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin. Infect. Dis.*, **39**: 971-979.
- ENTENZA, J.M., FOSTER, T.J., NI EIDHIN, D., VAUDAUX, P., FRANCIOLI, P., MOREILLON, P. 2000. Contribution of clumping factor B to pathogenesis of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **68** (9): 5443-5446.
- FOSTER, T.J. 2005. Immune evasion by Staphylococci. *Nat. Rev.*, **3**: 948-958.
- FOURNIER, B. & PHILPOTT, D. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.*, **18** (3): 521-540.
- FRAZEE, B.W., SALZ, T.O., LAMBERT, L., PERDREAU-REMYNGTON, F. 2005. Fatal community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in an immunocompetent young adult. *Ann. Emerg. Med.*, **46** (5): 401-404.
- GROOM, A.V., WOLSEY D.H., NAIMI T.S., SMITH, K., JOHNSON, S., BOXRUD, D., MOORE, K.A., CHEEK, J.E. 2001. Community-

acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. JAMA, **286**: 1201-1205.

- GROSS-SCHULMAN, S., DASSEY, D., MASCOLA, L., ANAYA, C. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA, **280** (5): 421-422.
- HALLIN, M., DENIS, O., DEPLANO, A., DE MENDONÇA, R., DE RYCK, R., ROTTIERS, S., STRUELENS, M.J. 2007. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. J. Antimicrob. Chemother., **59**: 465-472.
- HANSSSEN, A.M. & SOLLID, J.U.E. 2006. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **46** (1): 8-20.
- HAUCK, C.R. & OHLSEN, K. 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. Curr. Opin. Microbiol., **9**: 5-11.
- HEROLD, B.C, IMMERGLUCK, L.C., MARANAN, M.C., LAUDERDALE, D.S., GASKIN, R.E., BOYLE-VAVRA, S., LEITCH, C.D., DAUM, R.S. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. JAMA, **279** (8): 593-598.
- HIDRON, A.I., KOURBATOVA, E.V., HALVOSA, J.S., TERRELL, B.J., McDOUGAL, L.K., TENOVER, F.C., BLUMBERG, H.M., KING, M.D. 2005. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban

hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clin. Infect. Dis.*, **41**: 159-166.

- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. 2001 The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, **9**: 486-493.
- HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., YUZAWA, H., ITO, T. 2002. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, **292** (2): 67-74.
- HYNES, W.L. & WALTON, S.L. 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **183** (2): 201-207.
- ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K., MORI, N., TSUTSUMIMOTO, K., TIENSASITORN, C., HIRAMATSU, K. 2001. Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45** (5): 1323-1336.
- ITO, T., MA, X.X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. 2004. Novel type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* driven by a novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48** (7): 2637-2651.
- ITO, T., OKUMA, K., MA, X.X., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Upd.*, **6**: 41-52.

- IWATSUKI, K., YAMASAKI, O., MORIZANE, S., OONO, T. 2006. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J. Dermatol. Sci.*, **42**: 203-214.

- KANEKO, J. & KAMIO, Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structure, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** (5): 981-1003.

- KIM, E.S., SONG, J.S., LEE, H.J., CHOE, P.G., PARK, K.H., CHO, J.H., PARK, W.B., KIM, S.H., BANG, J.H., KIM, D.M., PARK, K.U., SHIN, S., LEE, M.S., CHOI, H.J., KIM, N.J., KIM, E.C., OH, M.D., KIM, H.B., CHOE, K.W. 2007. A survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.*, **60** (5): 1108-1114.

- KENER, J., O'CONNOR, T., PIANTANIDA, M., FISHBAIN, J., EBERLY, B., VISCOUNT, H., UYEHARA, C., HOSPENTHAL, D. 2003. Rates of carriage of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an outpatient population. *Infect. Control Hosp. Dis.*, **24** (6): 439-444.

- KLOOS, W.E., BALLARD, D.N., WEBSTER, J.A., HUBNER, R.J., TOMASZ, A., COUTO, I., SLOAN, G.L., DEHART, H.P., FIEDLER, F., SCHUBERT, K., DE LENCASTRE, H., SANCHES, I.S., HEATH, H.E., LEBLANC, P.A., LJUNGH, Å. 1997. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* species and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzymes genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47** (2): 313-323.

- KLUYTMANS-VANDENBERGH, M.F. & KLUYTMANS, J.A. 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clin. Microbiol. Infect., **12** (Suppl 1): 9-15.

- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN Jr., W.C. 1992. The Gram-positive cocci part I: Staphylococci and related organisms. In: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th. ed., Philadelphia, J.B. Lippincott Company, p. 405-430.

- LABANDEIRA-REY, M., COUZON, F., BOISSET, S., BROWN, E.L., BES, M., BENITO, Y., BARBU, E.M., VAZQUEZ, V., HÖÖK, M., ETIENNE, J., VANDENESCH, F., BOWDEN, M.G. 2007. *Staphylococcus aureus* Panton-Valetine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science, **315** (5815): 1130-1133.

- LAPLANA, L.M., CEPERO, M.A., RUIZ, J., ZOLEZZI, P.C., CALVO, M.A., ERAZO, M.C., GÓMEZ-LUS, R. 2007. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome mec type determination and dissemination of antibiotic resistance genes. Int. J. Antimicrob. Agents, **30** (6): 505-513.

- LEVINSON, W. & JAWETZ, E. 2005. Cocos Gram-positivos. In: Microbiologia Médica e Imunologia. 7^a. ed., Porto Alegre, Artmed, p. 103-105.

- L'HERITEAU, F., LUCET, J.C., SCANVIC, A., BOUVET, E. 1999. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission. JAMA, **282** (11): 1038-1039.

- LOEFFLER, A., BOAG, A.K., SUNG, J., LINDSAY, J.A., GUARDABASSI, L., DALSGAARD, A., SMITH, H., STEVENS, K.B., LLOYD, D.H. 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. J. Antimicrob. Chemother., **56**: 692-697.
- LOVSETH, A., LONCAREVIC, S., BERDAL, K.G. 2004. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. J. Clin. Microbiol., **42**: 3869-3872.
- LOWY, F.D. 1998. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med., **339** (8): 520-532.
- MA, X.X., ITO, T., TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHONGTRAKOOL, P., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S., HIRAMATSU, K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother., **46** (4): 1147-1152.
- McDOUGAL, L.K., STEWARD, C.D., KILLGORE, G.E., CHAITRAM, J.M., McALLISTER, S.K., TENOVER, F.C. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the United States: establishing a national database. J. Clin. Microbiol., **41** (11): 5113-5120.

- MURRAY, R.J. 2005. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. Intern. Med. J., **35**: S106-S119.

- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement. NCCLS, **24** (1).

- NAVARRE, W.W. & SCHNEEWIND, O. 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev., **63** (1): 174-229.

- NOUWEN, J., BOELENS, H., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. 2004. Human factors in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. Infect. Immun., **72**(11): 6685-6688.

- O`BRIEN, F.G., ZAINI, Z., COOMBS, G.W., PEARSON, J.C., CHRISTIANSEN, K., GRUBB, W.B. 2005. Macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in a dominant clone of Australian community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antim. Chem., **349**: 985-986.

- OLIVEIRA, D.C., MILHEIRIÇO, C. & DE LENCASTRE, H. 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob. Agents Chemother., **50** (10): 3457-3459.

- OLIVEIRA, D.C., THOMASZ, A., DE LENCASTRE, H. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic

backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.*, **7** (4): 349-361.

- O'RIORDAN, K. & LEE, J.J. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17** (1): 218-234.
- PACHECO, A.B., GUTH, B.E., SOARES, K.C., NISHIMURA, L., ALMEIDA, D.F., FERREIRA, L.C. 1997. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.*, **35** (6): 1521-1525.
- PALMA, M., WADE, D., FLOCK, M., FLOCK, J.I. 1998. Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, **273** (21): 13177-13181.
- PAN, E.S., DIEP, B.A., CHARLEBOIS, E.D., AUERSWALD, C., CARLETON, H.A., SENSABAUGH, G.F., PERDREAU-REMYNGTON, F. 2005. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and their relation to community-associated disease activity. *J. Infec. Dis.*, **192**: 811-818.
- PANHOTRA, B.R., SAXENA, A.K. & MULHIM, A.S. 2005. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* nasal colonization among patients at the time of admission to the hospital. *Ann. Saudi Med.*, **25** (4): 304-308.
- PARK, C., LEE, D.G., KIM, S.H., CHOI, S.M., PARK, S.H., CHUN, H.S., CHOI, J.H., YOO, J.H., SHIN, W.S., KANG, J.H., KIM, J.H.,

- LEE, S.Y., KIM, S.M., PYUN, B.Y. 2007. Predominance of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying staphylococcal chromosome cassette mec type IVA in South Korea. J. Clin. Microbiol., **45** (12): 4021-4026.
- PATEL, M., HOESLEY, C.J., MOSER, S.A., STAMM, A.M., BADDLEY, J.W., WAITES, K.B. 2008. Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital. South. Med. J., **101** (1): 40-45.
 - PATTI, J.M., BREMELL, T., KRAJEWSKA-PIETRASIK, D., ABDELNOUR, A., TARKOWSKI, A., RYDÉN, C., HÖÖK, M. 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. Infect. Immun., **62** (1): 152-161.
 - PEACOCK, S.J., DE SILVA, I., LOWY, F.D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? Trends Microbiol., **9**(12): 605-610.
 - PROJAN, S.J. & NOVICK, R.P. 1997. The molecular basis of pathogenicity. In: The staphylococci in human disease. Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds.). Churchill Livingstone, New York, p. 55-81.
 - RABELLO, R.F., SOUZA, C.R.V.M., DUARTE, R.S., LOPES, R.M.M., TEIXEIRA, L.M., CASTRO, A.C.D. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J. Dairy Sci., **88**: 3211-3219.

- RIBEIRO, A., DIAS, C., SILVA-CARVALHO, M.C., BERQUÓ, L., FERREIRA, F.A., SANTOS, R.N.S., FERREIRA-CARVALHO, B.T., FIGUEIREDO, A.M. 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J. Clin. Microbiol., **43** (4): 1985-1988.
- ROBINSON, D.A. & ENRIGHT, M.C. 2003. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., **47** (12): 3926-3934.
- SÁ-LEÃO, R., SANCHES, I.S., DIAS, D., PERES, I., BARROS, R.M., DE LENCASTRE, H. 1999. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? J. Clin. Microbiol., **37** (6): 1913-1920.
- SADER, H.S., JONES, R.N., GALES, A.C., SILVA, J.B., PIGNATARI, A.C., THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz. J. Infect. Dis., **8**: 25-79.
- SANTACOLOMA, L.O., BOUZA, J.M.E., DE LEJARAZU, R.O., GONZÁLEZ, P.C., ALCALDE, F.J.L. 2007. Epidemiological study of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in senior people centers. Rev. Esp. Quimioter., **20** (3): 339-345.
- SHOPSIN, B., MATHEMA, B., MARTINEZ, J., HA, E., CAMPO, M.L., FIERMAN, A., KRASINSKI, K., KORNBLUM, J., ALCABES, P.,

- WADDINGTON, M., RIEHMAN, M., KREISWIRTH, B.N. 2000. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. J. Infect. Dis., **182**: 359-362.
- SINHA, B., FRANÇOIS, P.P., NUSSE, O., FOTI, M., HARTFORD, O.M., VAUDAUX, P., FOSTER, T.J., LEW, D.P., HERRMANN, M., KRAUSSE, K.H. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. Cell. Microbiol., **1** (2): 101-117.
 - TAVARES, W. 2002. Resistência bacteriana. *In*: Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. 3a. ed., São Paulo, Atheneu, p. 55-144.
 - TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., **33**: 2233-2239.
 - THORNSBERRY, C. 1988. The development of antimicrobial resistance in staphylococci. J. Antimicrob. Chemother., **21** (Suppl C): 9-17.
 - TUNG, H., GUSS, B., HELLMAN, U., PERSSON, L., RUBIN, K., RYDÉN, C. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. Biochem. J., **345**: 611-619.

- UHLÉN, M., GUSS, B., NILSSON, B., GÖTZ, F., LINDBERG, M. 1984. Expression of the gene encode protein A in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. J. Bacteriol., **159** (2): 713-719.

- VAN DEN AKKER, E.L., NOUWEN, J.L., MELLES, D.C., VAN ROSSUM, E.F., KOPER, J.W., UITTERLINDEN, A.G., HOFMAN, A., VERBRUGH, H.A., POLS, H.A., LAMBERTS, S.W., VAN BELKUM, A. 2006. *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms. J. Infect. Dis., **194** (6): 814-818.

- VAN ELDERE, J., PEETERMANS, W.E., STRUELENS, M., DEPLANO, A., BOBBAERS, H. 2000. Polyclonal staphylococcal endocarditis caused by genetic variability. Clin. Infect. Dis., **31**: 24-30.

- VANDENBERGH, M.F.Q., YZERMAN, E.P.F., VAN BELKUM, A., BOELENS, H.A.M., SIJMONS, M., VERBRUGH, H.A. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. J. Clin. Microbiol., **37** (10): 3133-3140.

- VANDENESCH, F., NAIMI, T., ENRIGHT, M.C., LINA, G., NIMMO, G.R., HEFFERNAN, H., LIASSINE, N., BES, M., GREENLAND, T., REVERDY, M.E., ETIENNE, J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect. Dis., **9** (8): 978-984.

- VON EIFF, C., BECKER, K., MACHKA, K., STAMMER, H., PETERS, G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. N. Engl. J. Med., **344** (1): 11-16.

- VON EIFF, C., FRIEDRICH, A.W., PETERS, G., BECKER, K. 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diag. Microbiol. Infect. Dis., **49**: 157-162.

- VOURLI, S., PERIMENI, D., MAKRI, A., POLEMIS, M., VOYIATZI, A., VATOPOULOS, A. 2005. Community acquired MRSA infections in a paediatric population in Greece. Eurosurveillance, **10**: 78-79.

- VOYICH, J.M., OTTO, M., MATHEMA, B., BRAUGHTON, K.R., WHITNEY, A.R., WELTY, D., LONG, R.D., DORWARD, D.W., GARDNER, D.J., LINA, G., KREISWIRTH, B.N., DELEO, F.R. 2006. Is Panton-Valetine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? J. Infect. Dis., **194**: 1761-1770.

- WEIDENMAIER, C., KOKAI-KUN, J.F., KRISTIAN, S.A., CHANTURIYA, T., KALBACHER, H., GROSS, M., NICHOLSON, G., NEUMEISTER, B., MOND, J.J., PESCHEL, A. 2004. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. Nat. Med., **10** (3): 243-245.

- WERTHEIM, H.F.L., MELLES, D.C., VAS, M.C., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H.A., NOUWEN, J.I. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect. Dis., **5**: 751-762.

- WILKINSON, B.J. 1997. Biology. *In: The Staphylococci in human disease.* Kent B. Crossley & Gordon L. Archer (eds.), New York, Churchill Livingstone, p. 1-38.

- WINN JR., W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. 2006. Gram-positive cocci part *In: Staphylococci and related gram-positive cocci. In: Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* 6th. ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p. 623-671.

- ZHANG, K., MCCLURE, J.A., ELSAYED, S., LOUIE, T., CONLY, J.M. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (10): 5026-5033.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento para participação no estudo “Caracterização de populações de *Staphylococcus aureus* isoladas de colonização e de infecção”

Número de identificação no estudo:

Data: ___/___/___

Consentimento para ser participante no estudo

A. Objetivos do estudo

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo conduzido por duas professoras da Universidade Federal do Rio de Janeiro: Dra. Angela Christina Dias de Castro e Dra. Beatriz Meurer Moreira, e por seus estudantes, sob a coordenação da primeira. Este é um estudo para determinar a taxa de colonização por *Staphylococcus aureus* em estudantes do curso de graduação em Enfermagem e Obstetrícia da UFRJ, visando a comparação das amostras bacterianas, bem como de sua susceptibilidade aos antimicrobianos, entre os estudantes do ciclo básico (sem contato acadêmico com hospitais) e do profissionalizante (já atendendo em hospitais).

B. Procedimentos

Se você concordar em participar do estudo, ocorrerá o seguinte:

1. Você será solicitado(a) a responder um questionário sobre se esteve ou está com algumas doenças, uso de antibióticos e outros medicamentos, contatos familiares e atividades profissionais destes contatos. A entrevista irá demorar cerca de cinco minutos. As suas informações serão sigilosas, não serão fornecidas nem mesmo a familiares.
2. Após a entrevista, um “swab” de algodão esterilizado será introduzido em uma de suas narinas e recolocado novamente na embalagem.
3. Esse “swab” será processado no laboratório de pesquisa e possibilitará confirmar ou não a presença do *Staphylococcus aureus* em suas fossas nasais.

C. Riscos e Desconfortos

Caso considere alguma pergunta do questionário pessoal e não queira responder, você poderá fazê-lo. Você pode parar a entrevista a qualquer momento. Contudo, seu nome não aparecerá na folha do questionário e nem será usado em qualquer publicação. Apenas um número de identificação será usado nos documentos do estudo, com exceção desse

formulário. Todos os formulários serão mantidos em arquivos trancados a chave. Essa folha de identificação será mantida trancada em separado do questionário. A chave do arquivo será guardada com o coordenador do estudo.

D. Benefícios

O resultado de seu exame estará disponibilizado para você, embora nenhuma conduta terapêutica deva ser iniciada sem a apreciação de seu médico. Caso, no decorrer do seu curso de Enfermagem, você desenvolva alguma infecção de pele poderá vir ao laboratório realizar um exame para ver se a infecção está sendo causada pela bactéria em estudo. Em caso positivo será realizado o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. É importante que o material para exame seja coletado antes do início de qualquer terapia antimicrobiana.

E. Alternativas

Você poderá desistir da participação do estudo a qualquer momento.

F. Considerações financeiras

A sua participação não envolverá em custos para você, e também não envolverá remuneração financeira.

F. Dúvidas

Se você tiver dúvidas sobre o presente estudo, favor telefonar para a Prof. Angela Castro, no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, tel 2260-4193 ou 2562-6745.

H. Consentimento

Foi dada a mim uma cópia deste formulário de consentimento. A minha participação neste estudo é voluntária e eu sou livre para interromper essa participação ou solicitar minha exclusão do estudo a qualquer momento. Minha decisão em participar não vai ter nenhuma influência em cursar qualquer disciplina do curso médico.

Se você deseja participar, por favor, assine seu nome abaixo.

_____ /_____/_____
Assinatura do participante Data

_____ /_____/_____
Nome do participante (em letra de forma) Data

_____ /_____/_____
Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data

ANEXO II

Caracterização de populações de *Staphylococcus aureus* isoladas de colonização e de infecção - Questionário

1 – Data: ____/____/____

2 – Entrevistador: _____

3 – Digitador: _____

4 – Você já participou deste estudo antes? () SIM () NÃO

5 – Qual o período da Faculdade: 1º() 2º() 3º() 4º() 5º() 6º() 7º() 8º()

6 – Data de Nascimento: ____/____/____ ou Idade: _____

7 – Sexo: () M () F

8 – Local de Residência (Bairro): _____

9 – Qual a sua Raça ou Cor: Branca () Amarela () Indígena () Negra () Parda/Morena ()
Outra () _____ Não sabe () Nega-se a responder ()

10 – Você tem algumas destas doenças pré-existent diagnosticadas por médico: Diabetes
() Hipertensão () Doença renal () Outra: _____ Toma algum remédio
para esta doença? () SIM () NÃO

Se SIM qual o remédio? _____ Há quanto tempo? _____

11 – Usou antibiótico nos últimos 6 meses () SIM () NÃO
que antibiótico? _____
de ____/____/____ a ____/____/____

12 – Usou corticosteróide nos 6 últimos meses? () SIM () NÃO

13 – Você teve gripe ou resfriado nos 6 últimos meses: () SIM () NÃO
teve algum episódio no último mês? _____
tomou alguma medicação () SIM Qual? _____ () NÃO

14 – Algum episódio de diarreia nos 6 últimos meses? () SIM () NÃO
quando? _____
tomou alguma medicação () SIM Qual? _____ () NÃO

15 – Foi hospitalizado no ano precedente? () SIM de ____/____/____ a ____/____/____ ()
NÃO

16 – Contato com paciente hospitalizado nos últimos 6 meses? () SIM () NÃO de
____/____/____ a ____/____/____ Tipo de contato _____

17 – Reside com crianças menores de 5 anos que freqüentam creches? () SIM () NÃO

18 – Residiu com crianças que freqüentam creche nos últimos 6 meses? () SIM de ___/___/___ a ___/___/___ () NÃO

19 – Trabalha com crianças que freqüentam creches? () SIM () NÃO

20 – Trabalhou com crianças que freqüentam creches nos últimos 6 meses? () SIM de ___/___/___ a ___/___/___ () NÃO

21 – Trabalha ou faz estágio em hospital? () SIM () NÃO

22 – Trabalhou ou fez estágio em hospital nos últimos 6 meses? () SIM de ___/___/___ a ___/___/___ () NÃO

23 – Você tem contato domiciliar com indivíduo que trabalha em hospital? () SIM () NÃO

24 – Você teve contato domiciliar com indivíduo que trabalha em hospital nos últimos 6 meses? () SIM () NÃO

25 – Você tem contato domiciliar com indivíduo que trabalha em creches? () SIM () NÃO

26 – Você teve contato domiciliar com indivíduos que trabalha em creches nos últimos 6 meses? () SIM () NÃO

27 – Você tem contato domiciliar com animais? () SIM () NÃO

Que animal?

Cachorro ()

Gato ()

Pássaro ()

Tartaruga ()

Cavalo ()

Outro () Qual/ _____

28 – Você está com alguma lesão de pele? () SIM () Não

Você está tomando ou passando alguma medicação? () SIM () NÃO

Qual a medicação? _____

29 – Há alguém na família com alguma lesão de pele? () SIM () NÃO

30 – Você participaria novamente desta pesquisa nos dois últimos anos da faculdade? () SIM () NÃO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)