

**FERNANDA MATSIKO INOUE**

Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus*  
resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores  
de risco e diversidade genética

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo -  
Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

**São Paulo**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**FERNANDA MATSIKO INOUE**

Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus*  
resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores  
de risco e diversidade genética

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo -  
Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari  
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

**Co-orientadora:** Dra. Soraya Sgambatti de Andrade  
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro  
fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado de São Paulo (FAPESP).

**São Paulo**

**2008**

INOUE, Fernanda Matsiko

Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores de risco e diversidade genética / Fernanda Matsiko Inoue - São Paulo, 2008.  
xiv, 78 p

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Título em inglês: Oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infections in Hospital São Paulo (2002-2005): risk factors and genetic diversity.

Key-words: 1. *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, 2. Hemocultura, 3. Epidemiologia, 4. biologia molecular, 5. antibiograma.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

**Coordenador do curso de Pós-graduação:**

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

**São Paulo**

**2008**

# FERNANDA MATSIKO INOUE

Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus*  
resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores  
de risco e diversidade genética

## **BANCA EXAMINADORA:**

**Titular:** Prof. Dr. Aduino Castelo Filho

**Titular:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucieni de Oliveira Conterno

**Titular:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Moretti

**Suplente:** Prof. Dr. José Luís Nobre Rodrigues

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

“Dulcia non meruit, qui non gustavit amara.”

“Experientia praestantior arte.”

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari, pela honra de realizar meu mestrado sob sua orientação, por acreditar e reconhecer meu trabalho, pelo exemplo de profissional humano, competente e honrado. Meu respeito e eterna gratidão.

À minha co-orientadora Dra. Soraya Sgambatti de Andrade, pela paciência e dedicação durante o encaminhamento desta tese. Sua participação foi imprescindível para meu crescimento profissional e concretização deste estudo.

Ao Dr. Carlos Alberto Pires Pereira (Dr. Carlinhos), pela contribuição fundamental na revisão dos prontuários dos pacientes. Que os trabalhos em parceria com o LEMC continuem por muito tempo! MUITÍSSIMO Obrigada!

Profa. Dra. Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade, pela participação indispensável na análise dos resultados e sugestões valiosas no desenho deste estudo.

À Profa. Dra. Ana Cristina Gales, por todo o suporte laboratorial e ensinamentos preciosos. Sua competência e retidão são exemplos a todos os pós-graduandos do grupo LEMC/ALERTA.

A todos os professores e doutores da Disciplina de Infectologia da UNIFESP.

Ao Departamento de Medicina e Disciplina de Infectologia da UNIFESP.

À pós-doutoranda Miriam do Carmo, pela ajuda extremamente valiosa nos experimentos moleculares e pelos valiosos ensinamentos.

Fernanda Marques pela amizade, companheirismo, ensinamentos e “suporte emergencial” no processamento/análise dos géis de PFGE.

Jussimara Monteiro e os estagiários Vinícius Oliveira, Bruna Teixeira e Paula Ignez, pela amizade, momentos de descontração e esforço na realização dos géis de PFGE.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) e Disciplina de Infectologia do Hospital São Paulo/ UNIFESP.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves D’Azevedo, por sempre ser solícito e incentivador.

Às minhas queridas leoninas e pós-graduandas, Kelly Santiago e Kátia Kiyota, pela disposição de sempre ajudarem e ouvirem minhas lamúrias, por suportarem e compreenderem meus ataques de mau humor e pelas fartas risadas que compartilhamos. Meninas, não tenho palavras para agradecer nossa inabalável amizade!

Ao Rodrigo Cayô, pela amizade e bondade, por sempre estar disposto a ajudar nos momentos de apuros e suportar bravamente meu famigerado mau humor das segundas-feiras.

À Alinne Guimarães, pela amizade, companheirismo, altruísmo e saudosas hospedagens na sua casa.

À “parceira” Ana Paula Takano, pela amizade e “conselhos emocionais” tão divertidos. Você é força e prova de que sofrimento não é algo capaz de amargar a vida.

À pós-graduanda Andrea Pereira, pela grande amizade e sabedoria compartilhada.

Rodrigo Mendes, pelos ensinamentos e por ter me oferecido a oportunidade de integrar a equipe do LEMC.

Aos pós-graduandos Anderson Fernandes e Adriana Nicoletti, pela grande amizade, afeto e bondade nata.

A todos os pós-graduandos/amigos do laboratório: Adryella Luz, Amilton Mouro, Andréia Penteadó, Carlos Erbeste (“membro extra-oficial do LEMC”), Cecília Cergole, Danilo Xavier, Eloiza Campana, Itacy Siqueira, Loren Paschoal, Lorena Fehlberg, Marco Zonta, Martha Rivero, Paula Koga, Paula Peraro, Paulo Bispo, Raquel Girardello, Renata Picão, Thais Fernandes, pelo trabalho em grupo e por tornarem o LEMC/ALERTA um ambiente tão descontraído, delicioso e familiar.

A todos os funcionários do IDIPA/LEMC, em especial Rosana Capecce e Jacira Donizetti pelo carinho, trabalho e atenção.

A todos os novos estagiários que de alguma forma contribuíram para esta tese e a todos que já passaram pelo LEMC/ALERTA, em especial à Luciana, Cristiana e Priscilla.

Dra. Elisa Junko Ura Kusano, chefe da Microbiologia do HSPE, pelos grandes ensinamentos, incentivo, carinho e amizade.

À Dra. Nair Hosino, chefe da Microbiologia do HSPE, e equipe, por todos os preciosos ensinamentos, carinho e atenção.

A todos os meus queridos amigos-irmãos da UNESP/Botucatu; em especial Camila Marconi (Xeres), Lina Shinohara (Tôfú...), Mariana Braz (Juhá), Nahomi Yamaki (Brioxi), Aripuanã Watanabe (Gyraya) e Karen Oso; por provarem que distância física não interfere em grandes amizades, por serem tão presentes no meu coração e pensamentos e por fazerem meus dias nas suas respectivas companhias muito mais ensolarados.

Às minhas eternas amigas Tatiana e Bianca Nakamura, Sandra Watanabe, Mirian Akita, Claudia Ozeki e Ana Paula Miyamura, pela torcida e apoio em bons e maus momentos da minha vida.

Aos meus colegas e amigos baristas, em especial Cassio Becker, pelos momentos de descontração, maravilhosos cafés, por saberem tudo de *ristrettos*, *cappuccinos* e *machiattos* e não saberem nada de microbiologia, graças a Deus!

Às minhas irmãs Mayumi e Luriko, e aos meus cunhados Tony e Marcelo, pela nossa união e por traduzirem o real significado da palavra família.

Aos meus sobrinhos “Tutu” e Thomas, por tornarem o mundo mais fofo e alegre com suas existências!

Aos meus queridos pais Neusa e Itsuo Inoue, pelo apoio incondicional ao longo da minha vida e principalmente neste momento, por todos os sacrifícios realizados para me oferecerem sempre a melhor formação acadêmica, por me ensinarem princípios nobres e valorizar o trabalho honesto, por fazerem de mim uma pessoa mais íntegra e correta.

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epidemiologia .....	1
1.2. Fatores de Risco para Aquisição de MRSA .....	3
1.3. Mecanismos de Resistência .....	6
1.4. Epidemiologia Molecular.....	9
2. OBJETIVOS .....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1. Amostras Bacterianas.....	14
3.2. Dados Epidemiológicos .....	15
3.3. Confirmação da Identificação .....	16
3.4. PCR Multiplex para a Determinação do Tipo de SCC <i>mec</i> , Conforme Protocolo Desenvolvido por Zhang e Colaboradores.....	17
3.5. PCR Mutiplex para a Determinação do Tipo de SCC <i>mec</i> , Conforme Protocolo Desenvolvido por Milheiriço.....	21
3.6. Detecção de Produção de PVL (Panton Valentine Leukocidin).....	24
3.7. Análise do DNA Cromossômico.....	25
3.8. Cepas de <i>S. aureus</i> Utilizadas para Controle .....	27
3.9. Análise de Dados.....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1. Análise Epidemiológica .....	32
4.2. Caracterização Genética das Amostras.....	35
4.3. Tipagem Molecular .....	38

4.4. Fatores de risco para hemocultura positiva por MRSA SCC <i>mec</i> tipo III versus SCC <i>mec</i> não tipo III .....	41
4.5. Análise de sobrevida dos pacientes com bacteremia provocada pelo MRSA SCC <i>mec</i> tipo III versus SCC <i>mec</i> não tipo III .....	44
5. DISCUSSÃO .....	46
6. CONCLUSÃO .....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
8. RESUMO .....	75
9. ABSTRACT .....	76
10. ANEXO .....	77

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BHI** - "Brain Heart Infusion"

**CC** - complexo clonal

**ccr** - "cassette chromosome recombinase"

**CDC** - "Centers for Disease Control and Prevention"

**CEB** - Clone Epidêmico Brasileiro

**HSP** - Hospital São Paulo

**IRAS** - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

**MLST** - "multilocus sequence typing"

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

**MSSA** - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

**NNIS** – "National Nosocomial Infections Surveillance System"

**ORF** - "open reading frame"

**OSPC** - "Oceania Southwest Pacific Clone"

**PBP** - proteína ligadora de penicilina

**PFGE** - "pulsed field gel eletrophoresis"

**PVL** - leucocidina Panton-Valentine

**SCCmec** – "Staphylococcal Cassette Chromosome mec"

**ST** - "sequence type"

**UNIFESP** - Universidade Federal de São Paulo

**UPGMA** - "Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages"

**UTI** - Unidade de Terapia Intensiva

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Regiões alvo, cepas controles e número de acesso do GenBank.....	18
<b>Tabela 2.</b> Seqüência dos primers utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de SCCmec, segundo Zhang e colaboradores (2005).....	20
<b>Tabela 3.</b> Seqüência dos primers utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de SCCmec, segundo Milheiriço e colaboradores (2007).....	23
<b>Tabela 4.</b> Distribuição anual das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina isoladas de hemocultura do Hospital São Paulo no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005.....	32
<b>Tabela 5.</b> Características epidemiológicas de 148 pacientes com bacteremia causada por MRSA no período de 2002 a 2005.....	33
<b>Tabela 6.</b> Avaliação dos fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA pela análise univariada.....	42
<b>Tabela 7.</b> Avaliação dos fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA carreando diferentes tipos de SCCmec pela análise multivariada.....	43
<b>Tabela 8.</b> Comparação de bacteremias por MRSA no período 1995-1996 e 2002 - 2005 no Hospital São Paulo.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma das 160 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina do período de 2002 a 2005 selecionadas para estudo.....	31
<b>Figura 2.</b> Fluxograma da identificação do SCCmec das 148 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina selecionadas para estudo.....	36
<b>Figura 3.</b> Gráfico da distribuição das 148 amostras de MRSA analisadas de acordo com o tipo de SCCmec no período de 2002 a 2005.....	37
<b>Figura 4.</b> Dendograma de similaridade genética entre 148 isolados de MRSA de acordo com padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice.....	38
<b>Figura 5.</b> Análise de clusters das amostras contendo SCCmec tipo I com clones Chile/Córdoba e epidêmico brasileiro, utilizando coeficiente de Dice e método de UPGMA.....	39
<b>Figura 6.</b> Comparação dos isolados SCCmec IV com representantes de clones internacionais contendo SCCmec tipo IV, utilizando coeficiente de Dice e método de UPGMA.....	40
<b>Figura 7.</b> Curva de sobrevida atuarial (Kaplan-Meier) dos pacientes com bacteremia pelo SCCmec tipo III comparada às bacteremias causadas pelos demais tipos de SCCmec.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epidemiologia

*Staphylococcus aureus* é um patógeno amplamente disseminado em ambientes intra e inter-hospitalares, em parte devido à sua ubiquidade. Esta característica explica a freqüente facilidade de colonização entre os profissionais de saúde e entre pacientes (Calfee et al. 2003). O sistema nacional de notificação de infecções hospitalares dos Estados Unidos ("National Nosocomial Infections Surveillance System" - NNIS) considerou este microrganismo a causa mais comum de infecções hospitalares relatada entre 1992 e 2004 (NNIS, 2004).

Na América Latina, *S. aureus* foi o agente mais freqüentemente isolado de pele e tecidos moles (Sader et al. 2002b) e de infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados (Sader et al. 2002a). Neste último estudo, constatou-se que, no período compreendido entre 1997 a 2000, houve um aumento de cerca de 3% na freqüência de isolamento deste patógeno em hemoculturas, dos quais 30,6% dos mesmos eram resistentes à oxacilina. Estudos mais recentes do Programa de Vigilância SENTRY ("SENTRY Antimicrobial Surveillance Program") demonstram que *S. aureus* continua a ser o patógeno predominante de infecções de pele e tecidos moles na América Latina, América do Norte e Europa, no período compreendido entre 1998 a 2004 (Moet et al. 2007).

Historicamente, a resistência às penicilinas em *S. aureus* se desenvolveu na década de 40, logo após a introdução da mesma na prática clínica, a princípio dentro dos hospitais e, posteriormente, disseminando-se

para a comunidade (Chambers 2001). O surgimento de resistência à meticilina (*S.aureus* resistentes à meticilina - MRSA ou à oxacilina - ORSA), documentada um ano após a introdução desta penicilina semi-sintética na década de 60, se conduziu da mesma forma e tem sido um grande problema, principalmente no controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) devido, entre outros fatores, à transmissão cruzada entre pacientes e profissionais de saúde (Ipsen and Gahrn-Hansen 1988; Kayser 1975; Moreno et al. 1995). Desde então, este patógeno resistente é endêmico em vários hospitais espalhados ao redor do mundo (Haddadin et al. 2002; Moreira et al. 2007).

Nos Estados Unidos, de acordo com dados de vigilância do estudo NNIS, a prevalência de infecções por este patógeno resistente aumentou de 35,9% em 1992 para 64,4% em 2003, em pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) adulta e pediátrica dos hospitais avaliados (NNIS, 2004; Klevens et al. 2006).

Na Argentina, um estudo de vigilância que envolveu 27 centros médicos identificou 58% de resistência à meticilina durante o período de 1996 a 1998 (Bantar et al. 2000). Outro estudo adicional, pertencente ao Consórcio Internacional de Controle de Infecção, envolvendo 10 UTIs colombianas, observou 65,4% de isolados de MRSA (Moreno et al. 2006).

Vários relatos demonstraram uma alta frequência de MRSA em pacientes com bacteremias admitidos em hospitais brasileiros. Em alguns estudos, taxas próximas a 80% foram identificadas em pacientes internados em hospitais universitários (Conterno et al. 1998; Guilarde et al. 2006; Moreira et al. 1998). Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

comparou taxas de mortalidade entre bacteremias causadas por MRSA e MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina) no período de 1995 a 1996. Houve diferença significativa entre essas taxas, sendo que a mortalidade atribuída a MRSA na época foi de 42% (Conterno, 1999).

Um estudo caso-controle, que investigou 282 casos de infecção hospitalar durante os anos de 2000 a 2001, realizado em hospital universitário na cidade de Goiânia, confirma este alto percentual, no qual 58,3% de 84 casos de bacteremias foram atribuídas a MRSA (Guilarde et al. 2006).

Estudo realizado em um hospital universitário na cidade de São Paulo no período de 2002 a 2003 investigou amostras de MRSA isoladas de hemoculturas de 203 pacientes. Neste trabalho, observou-se uma alta taxa de mortalidade dos pacientes infectados (46%) até quatro semanas após o isolamento laboratorial de MRSA (Trindade, 2005).

## **1.2. Fatores de Risco para Aquisição de MRSA**

Diversos são os fatores de risco apontados para a aquisição de infecções por MRSA. Variações da maior ou menor prevalência destes fatores ocorrem de acordo com a localização geográfica, a instituição e a população de pacientes estudada (Oztoprak et al. 2006; Wang et al. 2008). De um modo geral, os fatores de risco mais citados na literatura científica relacionados à aquisição de bacteremia por MRSA são: antibioticoterapia prévia; permanência prolongada em UTI; uso de cateteres venosos centrais e urinários; infecções e colonização prévia por MRSA; hospitalização prévia e presença de comorbidades (Carnicer-Pont et al. 2006; Guilarde et al. 2006; Rezende et al. 2002) (Conterno, 1999).

Considerado consenso em diversos trabalhos, um dos principais fatores de risco de grande relevância é a utilização prévia de antimicrobianos tais como quinolonas, glicopeptídeos e cefalosporinas, os quais favorecem a pressão seletiva para aquisição de MRSA (Shorr 2007; Tacconelli et al. 2008). Em um hospital situado em Bruxelas, na Bélgica, a utilização prévia de antimicrobianos é citada como o principal fator de risco para infecções da corrente sanguínea por MRSA, sendo 68% das mesmas associadas ao uso de algum destes agentes (Libert et al. 2008). Estudos realizados em hospitais terciários na Turquia e Espanha, que compararam fatores de risco para MRSA e MSSA, observaram que a permanência acima de 48 horas em UTI estava correlacionada à aquisição de MRSA (Garcia-Vazquez et al. 2007; Oztoprak et al. 2006). No caso específico da Turquia, 47% dos casos de bacteremia por *S. aureus* estavam relacionados e intimamente ligados à excessiva prática de procedimentos invasivos que ocorrem neste tipo de unidade.

A análise univariada de um estudo caso-controle, realizado em um hospital do Reino Unido, demonstrou que o uso de catéter central e/ou urinário foi relacionado a 62% dos casos de MRSA isolados de episódios de bacteremia entre os anos de 2002 a 2003 (Carnicer-Pont et al. 2006). Catéter urinário também foi relatado como importante fonte de infecção de corrente sanguínea principalmente em pacientes mais idosos que fazem uso deste dispositivo com maior frequência (Rezende et al. 2002).

Infecção prévia ou colonização por MRSA são citados em vários trabalhos de diferentes regiões geográficas como responsáveis pelo aumento do número de bacteremias causadas por este patógeno (Huang and Platt 2003; Manzur et al. 2007; Tacconelli 2006). Estudo caso-controle conduzido em

hospital universitário na Espanha, que analisou 50 pacientes com bacteremia por MRSA, demonstrou que mais de 50% destes estavam relacionados a um dos fatores acima citados (Manzur et al. 2007).

No início da década de 90, foi desenvolvido na UNIFESP estudo que avaliou as diferenças entre infecções de corrente sanguínea causadas por MSSA e MRSA (Conterno et al. 1998). Maiores taxas de mortalidade foram identificadas entre pacientes com bacteremia por MRSA, informação ratificada após análise multivariada. Análise adicional, ajustada por resistência à meticilina, mostrou algumas variáveis associadas à maior mortalidade dos pacientes infectados: idade acima de 60 anos, presença de pneumonia, choque séptico e antibioticoterapia inadequada.

Dando continuidade ao estudo acima, os autores analisaram fatores possivelmente relacionados à mortalidade por *S. aureus* em um segundo período (1995-1996) (de Oliveira et al. 2002). A comparação dos dois períodos revelou que a resistência à meticilina permaneceu como fator de risco para maior mortalidade entre os pacientes com infecção de corrente sanguínea por *S. aureus*.

Estudo recente de Trindade (2005), após analisar no Brasil 197 pacientes com bacteremias por MRSA, observou que quase 50% evoluíram para óbito em até quatro semanas de internação e o restante até o final da admissão hospitalar. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, com média de idade de 48 anos, e apenas 2% dos casos foram adquiridos na comunidade. 60% das infecções foi considerada primária, 14% pneumonia, e 12% infecção do sítio cirúrgico. A maioria dos pacientes havia utilizado

antibiótico prévio. Entretanto, este estudo não analisou e/ou calculou os fatores de risco para aquisição de MRSA em infecções de corrente sanguínea.

### **1.3. Mecanismos de Resistência**

O vasto conteúdo genético de *S. aureus* para adaptação a mudanças e ambientes hostis foi demonstrado pelo surgimento de cepas que apresentam mecanismos de resistência a virtualmente todos os antimicrobianos. Isto ocorreu logo após a introdução destes agentes na prática clínica para tratamento de infecções causadas por este patógeno (Oliveira et al. 2002).

A resistência à meticilina em *S. aureus* é decorrente da alteração do sítio de ação dos  $\beta$ -lactâmicos (Brumfitt and Hamilton-Miller 1989; Chambers and Sachdeva 1990; Lyon and Skurray 1987). Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos agem através da inibição de enzimas que desempenham um papel importante na síntese da parede bacteriana. Essas enzimas catalisam a etapa final da síntese da parede celular e, por serem o sítio de ação das penicilinas, passaram a ser chamadas de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Estas PBPs catalisam a reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptideoglicano, constituintes da parede celular bacteriana. As PBPs normalmente possuem alta afinidade de ligação aos  $\beta$ -lactâmicos e são inibidas por concentrações muito baixas destes agentes.

*S. aureus* possui normalmente quatro PBPs, e se torna resistente aos compostos  $\beta$ -lactâmicos através da produção de uma PBP adicional, denominada PBP2a ou PBP2', uma proteína de 78-kDa (Brumfitt and Hamilton-Miller 1989; Chambers 1997). Esta nova PBP substitui a função das demais PBPs neste patógeno, permitindo que o microrganismo sobreviva em

concentrações de  $\beta$ -lactâmicos que, em outras condições, seriam letais. Conseqüentemente, a resistência à metilina em *S. aureus* confere resistência a todos os demais agentes  $\beta$ -lactâmicos, inclusive às cefalosporinas (Chambers 1997).

A codificação destas novas PBPs está relacionada à aquisição do gene *mecA* pelo *S. aureus*. Este gene faz parte de um elemento genético móvel encontrado em todos os isolados de MRSA. Katayama e colaboradores, em 2000, demonstraram que o gene *mecA* faz parte de um elemento genômico designado cassete estafilocócico do cromossomo *mec* ("staphylococcal cassette chromosome *mec*" - SCC*mec*), integrado ao cromossomo de *S. aureus* e localizado próximo à sua origem de replicação (Hiramatsu et al. 2002; Katayama et al. 2000). Atualmente são conhecidos seis diferentes tipos de SCC*mec*, variando em tamanho de 21 a 67 kb. O SCC*mec* é composto, dentre outros, do complexo do gene *mec*, que codifica resistência à metilina, e do complexo do gene *ccr* (do inglês "cassette chromosome recombinase"), que codifica recombinases responsáveis pela sua mobilidade. Além disso, uma região denominada J (derivada do termo inglês "junkyard") compõe o restante do material genético do complexo SCC*mec*. Não se sabe ao certo qual a importância desta região em termos funcionais para o MRSA (exceto genes que codificam resistência para outros agentes antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos e metais pesados). No entanto, esta região é de grande importância para auxiliar na classificação dos diferentes tipos de SCC*mec*.

O complexo do gene *mecA* é composto do gene propriamente dito e de seus genes regulatórios *mecI* e *mecR1*, localizados na região posterior ao promotor do gene *mecA*. O gene *mecI* codifica uma proteína que se liga ao

DNA e reprime a transcrição do gene *mecA*, enquanto que o gene *mecR1* codifica uma proteína que promove a transcrição do gene *mecA* na presença de  $\beta$ -lactâmicos (Sharma et al. 1998). São conhecidas quatro classes deste complexo, nomeadas de A a D, que divergem entre si de acordo com a presença de determinadas seqüências de inserção (seqüências de DNA envolvidas com a mobilização de informação genética, de função similar aos plasmídeos) (Katayama et al. 2001).

O complexo *ccr* é composto pelos genes *ccrA* e *ccrB*, duas ORFs (“open reading frames”) localizadas no complexo *SCCmec*, responsáveis pela codificação de polipeptídeos que têm como função a excisão e integração do *SCCmec* no cromossomo estafilocócico (Katayama et al. 2000). Esses genes são designados de *ccrA1* e *ccrB1* (em *SCCmec* tipo I), *ccrA2* e *ccrB2* (em *SCCmec* tipo II), *ccrA3* e *ccrB3* (em *SCCmec* tipo III), *ccrA4* e *ccrB4* (em *SCCmec* tipo IV). Mais recentemente foi descrito um novo *ccr* denominado *ccrC* encontrado em amostras tipo V (Ito et al. 2004).

Os menores *SCCmec* (tipos I, IV e V) contêm, geralmente, somente recombinases e genes estruturais e regulatórios para resistência à meticilina. Por outro lado, os tipos II e III possuem elementos de transposição e genes codificadores de resistência aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos. Os isolados que contêm os tipos I, II e III possuem classicamente origem hospitalar e os tipos IV e V têm origem comunitária (Deresinski 2005). Oliveira e colaboradores identificaram em 2006 um novo tipo de *SCCmec* (tipo VI), anteriormente classificado como tipo IV pelo mesmos pesquisadores. Esta re-classificação foi relacionada a um novo alotipo de *ccrAB* (*ccrAB4*) presente em uma das primeiras amostras descritas deste clone (HDE288) (Oliveira et al. 2006).

#### **1.4. Epidemiologia Molecular**

São descritos cinco clones principais de MRSA disseminados internacionalmente, denominados "clones epidêmicos" devido à capacidade de se disseminar e causar infecções em regiões geográficas distintas, até mesmo entre continentes. De acordo com a característica epidemiológica ou o local onde cada um deles foi inicialmente descrito, os clones foram classificados como: Ibérico, Brasileiro, Húngaro, Nova Iorque/Japão, e pediátrico epidêmico (Oliveira et al. 2002).

O clone Ibérico foi descrito inicialmente na Espanha em 1989 e desde então tem sido identificado em outros países da Europa e nos Estados Unidos (Roberts et al. 1998; Sa-Leao et al. 1999; Sanches et al. 1995). Além de encontrar-se amplamente disseminado em hospitais da Hungria, o clone Húngaro foi recentemente identificado em Taiwan (Aires de et al. 2003). De acordo com estudos mais recentes, observa-se a diminuição da incidência deste clone em países como Espanha e Portugal, nos quais ocorre a emergência de outros clones com menor espectro de resistência a não  $\beta$ -lactâmicos (Cuevas et al. 2007).

O clone Nova Iorque/Japão foi inicialmente considerado o clone de MRSA predominante em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque e algumas regiões adjacentes, além de ter sido identificado também em um hospital em Tóquio, Japão (Aires de et al. 2000). Atualmente, além deste clone ter sido detectado em outros países como Hungria e México, é considerado nos Estados Unidos como principal clone em casos de infecção relacionada à assistência à saúde (McDougal et al. 2003). Somente um relato no Brasil até hoje foi relacionado a este clone (de Miranda et al. 2007).

Após seu isolamento em uma instituição pediátrica em 1992, o clone pediátrico epidêmico já foi reportado na Polônia, Estados Unidos, Argentina, e Colômbia (Gomes et al. 2001;Roberts et al. 1998;Sa-Leao et al. 1999). No Brasil, este clone já foi documentado como colonizante na cidade do Rio de Janeiro (Melo et al. 2004) e em Recife (de Miranda et al. 2007).

O clone epidêmico Brasileiro (CEB) foi descrito inicialmente em 1993 (Sader et al. 1994), em um estudo realizado na cidade de São Paulo, e encontra-se amplamente disseminado por várias regiões do mundo, incluindo países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, e Uruguai) e Europa (República Tcheca e Portugal) (Gomes et al. 2001;Aires de et al. 2001). No Brasil, este clone de MRSA pôde ser identificado em diferentes hospitais, da região norte até o sul do país, freqüentemente associado a surtos epidêmicos (Oliveira et al. 2001;Teixeira et al. 1995).

Estudos realizados com isolados de MRSA recuperados em hospitais na década passada demonstraram uma predominância do clone epidêmico brasileiro dentre as amostras de MRSA avaliadas. Um dos primeiros relatos descrevendo a emergência do CEB já demonstrava a alta freqüência do mesmo dentre os isolados de MRSA de cinco cidades brasileiras: São Paulo, Rio de Janeiro, Niterói, Porto Alegre e Manaus (Teixeira et al. 1995). Neste estudo, o CEB pôde ser identificado em 77% de todas as amostras de MRSA isoladas de vários sítios de infecção, coletadas entre os anos de 1992 a 1994.

Esta predominância no Brasil foi também demonstrada por um estudo conduzido com amostras de MRSA coletadas entre 1995 e 1997, provenientes de 19 cidades brasileiras (Oliveira et al. 2001). Dentre os 83 isolados selecionados para tipagem molecular, a maioria (80,3%) apresentou padrão

idêntico ao clone brasileiro de MRSA. Na cidade de São Paulo, poucos estudos foram conduzidos após 1993, para verificar se este clone ainda persiste em hospitais desta localidade. Aires de Souza, em 2001, publicou um estudo envolvendo seis hospitais no Estado de São Paulo, dos quais foram coletados 162 isolados de MRSA durante o período de 1996 a 1998, e verificou que 97% deles eram relacionados ao CEB (Aires de et al. 2001).

Após alguns anos, um estudo conduzido no complexo do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo identificou quatro padrões de PFGE (“pulsed field gel eletrophoresis”) dentre 151 isolados de MRSA obtidos de hemoculturas no período de 2002 a 2003. Foi possível observar, além de uma linhagem predominante relacionada ao CEB (*SCCmec* IIIa), um perfil distinto contendo *SCCmec* IV que se destacou em um número expressivo, sugerindo uma linhagem emergente de MRSA (de Trindade et al. 2005;Trindade, 2005). Infelizmente o padrão de bandas desta linhagem não foi comparada com os clones disseminados em outras localidades. Ainda assim, o caráter intra-hospitalar destas amostras e a ausência da produção de PVL (leucocidina Panton-Valentine, presente na maioria dos clones com *SCCmec* IV) sugerem que sejam relacionadas ao clone pediátrico (Trindade, 2005;Vidal, 2007).

Verificou-se em outro estudo brasileiro cinco casos de MRSA com comprovada origem comunitária, portando *SCCmec* tipo IV, na região sul do país (Ribeiro et al. 2005). Os isolados, quando comparados pelo método de PFGE, apresentaram similaridade genética a uma linhagem identificada como comunitária na Austrália (“Oceania Southwest Pacific Clone” - OSPC).

No Hospital São Paulo (HSP), pertencente à UNIFESP, os últimos estudos descrevendo a epidemiologia molecular dos isolados de MRSA foram

realizados com amostras coletadas na década passada. Durante os períodos de 1991 a 1992, e de 1995 a 1996, foi observado que 86% dos isolados de MRSA coletados de hemoculturas de pacientes hospitalizados no HSP pertenciam ao clone epidêmico brasileiro (Conterno, 1999). Entretanto, em 2005, um estudo que padronizou diferentes protocolos de PFGE e analisou cinco isolados clínicos de MRSA coletados de hemoculturas no período de 2000 a 2004 observou diferentes padrões de PFGE (Monteiro, 2005). Nenhuma das cinco amostras era idêntica entre si, e, além disso, todas eram distintas do CEB tanto pelos critérios padronizados por Pfaller e colaboradores (1992), quanto pelos critérios de Tenover (Tenover et al. 1995).

Trabalhos publicados a respeito da clonalidade de *S. aureus* são freqüentemente complementados pela técnica denominada "multilocus sequence typing" (seqüenciamento multilocus – MLST). A técnica baseia-se na análise de seqüências de sete genes conservados ("housekeeping genes") do microrganismo, no qual diferentes seqüências correspondem a diferentes alelos de cada gene e a um determinado tipo de seqüência denominado ST ("sequence type"). Isolados com os sete alelos semelhantes são relacionados a um mesmo complexo clonal (CC), sendo que, dentre a maior parte dos MRSA circulantes, destacam-se cinco linhagens: CC8, CC5, CC30, CC45, e CC22 (Enright et al. 2000; Enright et al. 2002). Os resultados de MLST são inseridos em uma base de dados digital no endereço <http://www.mlst.net>, o que permite comparações entre seqüências de *S. aureus* descritas em diferentes partes do mundo. A respeito dos clones mundiais, foram classificados pelo MLST como: ST-239 (CEB), ST-5 (clones pediátrico e Nova Iorque/Japão), e ST-247 (Ibérico).

## 2. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) isoladas de hemoculturas de pacientes admitidos no Hospital São Paulo, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005, através de PFGE e reação em cadeia da polimerase (PCR);
- ✓ Avaliar possíveis fatores de risco associados à bacteremia e mortalidade causada pelo Clone Epidêmico Brasileiro e por outros clones de MRSA identificados através das técnicas moleculares acima mencionadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras Bacterianas

Trata-se de um estudo de prevalência no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005. As amostras foram selecionadas do Banco de Microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - LEMC, da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Neste período, foram armazenadas todas as amostras isoladas de hemoculturas positivas de pacientes hospitalizados no Hospital São Paulo (hospital universitário, público e terciário com mais de 600 leitos), pertencente ao complexo UNIFESP. Um total de 707 hemoculturas de pacientes distintos foram positivas para *S. aureus* neste período, sendo 45,5% (n = 322) resistentes à oxacilina.

O cálculo do tamanho da amostra para este estudo levou em conta uma estimativa de 70% de prevalência do CEB dentre as amostras de MRSA, erro de 10% e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Esta estimativa foi baseada em dois trabalhos realizados na cidade de São Paulo, com isolados coletados nos anos de 1995/1996 (Conterno, 1999), e na cidade do Rio de Janeiro entre 1996 a 1998 (Aires de et al. 2001). A porcentagem do CEB nestes estudos foi de 86% (43 / 50) e 97% (157 /162), respectivamente.

De acordo com os estudos anteriores, de 1996/1998 a 2002 (início do presente estudo), esperava-se uma redução de 20% na prevalência do CEB, o que já seria considerado estatisticamente significativo. Assim, para o estudo de prevalência cerca de 80 amostras de MRSA deveriam ser investigadas para que o estudo tivesse poder em detectar prevalências do CEB variando de 60 a 80%. Para o estudo de fatores de risco associados à bacteremia pelo CEB

calculou-se que seriam necessários 160 amostras de MRSA (efeito de desenho = 2,0). Portanto, este estudo será representativo de quase metade das amostras de bacteremia por MRSA no período, nesta instituição. A análise foi realizada no programa Epi Info versão 3.3 (CDC, Atlanta, GA, USA).

Os grupos controles foram selecionados a partir da identificação dos tipos de *SCCmec* das amostras (item 3.3). Após este procedimento, foram selecionados como controles as amostras contendo *SCCmec* diferentes do tipo III, avaliando assim os fatores de risco e mortalidade de pacientes com bacteremias provavelmente associadas ao CEB.

### **3.2. Dados Epidemiológicos**

Foram obtidos os seguintes dados dos prontuários dos pacientes:

- ✓ Internação hospitalar atual: data de internação, local e período em dias até a hemocultura positiva para MRSA;
- ✓ Data do pedido da hemocultura positiva para MRSA;
- ✓ Idade: definida em anos completos;
- ✓ Sexo;
- ✓ Internação hospitalar prévia;
- ✓ Internação em UTI;
- ✓ Sepsis;
- ✓ Evolução do quadro clínico após bacteremia: óbito relacionado ou resolução da infecção.
- ✓ Origem da infecção: hospitalar, comunitária ou indeterminada;
- ✓ Fonte da infecção: associada à catéter; pele; ouvido, nariz, garganta, seios da face; urina; gastrointestinal; pulmonar; ferida cirúrgica e outras;

- ✓ Presença de fatores de risco para infecção: catéter venoso central ou periférico, ventilação mecânica, transplante, diálise, catéter urinário e outros;
- ✓ Ocorrência de procedimentos cirúrgicos;
- ✓ Uso prévio de antimicrobianos: nome(s) da(s) droga(s), período e tempo de uso;
- ✓ Antibioticoterapia adequada (uso de vancomicina) ou inadequada/ausente após a detecção da bacteremia.

### **3.3. Confirmação da Identificação**

Todas as amostras de MRSA selecionadas para o presente estudo foram submetidas à confirmação da identificação da espécie, utilizando técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) para a detecção do gene *nuc*, específico da espécie *S. aureus*. Os primers foram desenhados em nosso laboratório, a partir da cepa MRSA 252 (seqüência do DNA obtida pelo número de acesso GenBank NC\_002952) e posteriormente encaminhados para síntese (IDT - Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, EUA).

5` GCCACGTCCATATTTATCAG 3`nuc - R1

5` TATGGTCCTGAAGCAAGTG 3`nuc - F1

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a metodologia de extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (2005). Para isso, de uma a cinco colônias bacterianas, crescidas em placa de ágar Columbia (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) acrescido de sangue de carneiro a 5%, foram

suspensas em 50  $\mu$ L de água destilada estéril contidos em tubo eppendorf. Os eppendorfs foram aquecidos a 99°C em “banho Maria” durante cerca de 10 minutos. Após esta etapa, os tubos foram submetidos a centrifugação durante 3 minutos a 13000 rpm. Uma alíquota de 40  $\mu$ L do sobrenadante foi estocado em freezer e utilizado posteriormente 0,5  $\mu$ L desta para a reação de PCR (volume final de 10  $\mu$ L).

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 5  $\mu$ L de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 1  $\mu$ L de *primers*, 3,5  $\mu$ L de água estéril deionizada e 0,5  $\mu$ L do produto da extração bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa terminou com uma extensão adicional de 10 min a 72°C e mantidos a 20°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X durante 25 minutos a 120 V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os fragmentos de DNA de 117 pb foram visualizados e fotografados em transiluminador ultravioleta.

### **3.4. PCR Multiplex para a Determinação do Tipo de SCC*mec*, Conforme Protocolo Desenvolvido por Zhang e Colaboradores**

A determinação do tipo de SCC*mec* e do gene *mecA* foi realizada utilizando-se o método de PCR mutiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Zhang e colaboradores (Zhang et al. 2005). O protocolo detecta os

SCCmec tipos I a V, incluindo quatro subtipos de SCCmec tipo IV (IVa, IVb, IVc, e IVd), utilizando apenas 9 *loci*, selecionados com base em seqüências do SCCmec descritas previamente e disponíveis no banco de dados GenBank (“National Center for Biotechnology Information”; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index>) (Ito et al. 1999; Ito et al. 2001). As respectivas regiões alvo, cepas e números de acesso do GenBank no qual este protocolo foi delineado estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Regiões alvo, cepas controles e número de acesso do GenBank.

SCCmec	Região	Cepa	Número de acesso GenBank
tipo I	ORF E008	NCTC 10442	AB033763
tipo II	kdpE	N315	D86934
tipo III	ORF CZ049	85/2082	AB37671
tipo IVa	ORF CQ002	CA05	AB063172
tipo IVb	ORF CM001	8/6-3P	AB063173
tipo IVc	ORF CR002	MR108	AB096217
tipo IVd	ORF CG001	JCSC4469	AB0967677
tipo V	ORF V011	JCSC3624	AB12121

Para a detecção do gene *mecA*, foi utilizado a cepa NCTC8325 (número de acesso GenBank X52593). As seqüências dos primers utilizados nas

reações de PCR multiplex para a determinação dos tipos de *SCCmec* estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Seqüência dos primers utilizados na PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*, segundo Zhang e colaboradores (2005).

<b>Primer<sup>(1)</sup></b>	<b>Seqüência de oligonucleotídeos</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>	<b>Especificidade</b>
Tipo I-F	GCTTTAAAGAGTGTGCTTACAGG	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
Tipo II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
Tipo III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG		
Tipo IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		
Tipo IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
Tipo IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
Tipo IVd-F	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo IVd-R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
Tipo V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325	SCC <i>mec</i> V
Tipo V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
MecA147-F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147	<i>mecA</i> (controle interno)
MecA147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT		

<sup>1</sup> Adaptado de Zhang e colaboradores, 2005.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (2005), como descrito no item 3.2. Uma alíquota de 40  $\mu$ L do sobrenadante foi estocado em freezer e utilizado posteriormente 2  $\mu$ L do sobrenadante para a reação de PCR (volume final de 25  $\mu$ L).

Para a PCR foi utilizada as seguintes condições de reação: 12,5  $\mu$ L de Master Mix para multiplex (Qiagen, Valencia, CA, EUA), um total de 7,7  $\mu$ L de primers, 2,8  $\mu$ L de água estéril deionizada e 2  $\mu$ L do sobrenadante da extração de DNA. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguido por 10 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 65°C e 1,5 min a 72°C e outros 25 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C e 1,5 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 20°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como demonstrado no item 3.3.

### **3.5. PCR Mutiplex para a Determinação do Tipo de SCCmec, Conforme Protocolo Desenvolvido por Milheiriço**

Trata-se de um protocolo publicado em 2007 (Milheirico et al. 2007) como atualização da publicação feita em 2002 por Oliveira e de Lencastre (Oliveira 2002), no qual é possível identificar os seis tipos de SCCmec. Todas as amostras de MRSA não identificadas pelo protocolo de Zhang e colaboradores (2005) foram submetidas a este protocolo.

Este protocolo utilizou um total de 10 *loci*, selecionados com base nas seqüências do elemento *mec*. Neste protocolo atualizado foram acrescentados oito novos *primers* que não constavam no protocolo de 2002 com o intuito de detectar o *ccrB* alotipo 2 (específico para tipos II e IV), *ccrC* e a região J1 do tipo V (específicos para tipo V), e a região J1 do SCC*mec* III. As respectivas seqüências de primers utilizadas para identificar cada tipo de SCC*mec* deste protocolo estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Seqüência dos primers utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de *SCCmec*, segundo Milheiriço e colaboradores (2007).

<b>Primer</b>		<b>Seqüência de oligonucleotídeos</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>	<b>Especificidade</b>
CIF2 F2	CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	<i>SCCmec</i> tipo I
<i>ccrC</i> F2	<i>ccrC</i> R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	<i>SCCmec</i> tipo V
RIF5 F10	RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATCCATCAATGC	414	<i>SCCmec</i> tipo III
<i>SCCmec</i> V J1 F V J1 R		TTCTCCATTCTTGTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	<i>SCCmec</i> tipo V
<i>dcs</i> F2	<i>dcs</i> R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	<i>SCCmec</i> tipos I, II e IV
<i>ccrB2</i> F2	<i>ccrB2</i> R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	311	<i>SCCmec</i> tipos II e IV
kdp F1	kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	<i>SCCmec</i> tipo II
<i>SCCmec</i> III J1 F <i>SCCmec</i> III J1 R		CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	<i>SCCmec</i> tipo III, J1
mecl P2	mecl P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCATTGTC	209	<i>SCCmec</i> tipos II e III
mecA P4	mecA P7	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCTTCATATCTTGTAACG	162	<i>mecA</i> (controle interno)

<sup>2</sup> Adaptado de Milheiriço e colaboradores, 2007.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo de Soelingen e colaboradores (1991). Para a PCR foi utilizada a seguinte reação: 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 200 nM dos primers kdp F1, kdp R1, 400 nM dos primers CIF2 F2, CIF2 R2, SCC*mec* III J1F, SCC*mec* III J1R, SCC*mec* V J1 F, SCC*mec* V J1 F, RIF5 F10, RIF5 F13, 800 nM dos primers mecl P2, mecl P3, DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7, *ccrB2* F2, *ccrB2* R2, *ccrC* F2, *ccrC* R2 e 5 ng de DNA. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 4 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 4 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 20°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como demonstrado no item 3.3.

### **3.6. Detecção de Produção de PVL (Panton Valentine Leukocidin)**

A detecção do gene responsável pela síntese da leucocidina Panton Valentine foi realizada segundo protocolo de Ribeiro e colaboradores (2005). Os primers foram desenhados com base na seqüência do gene *lukF*, disponível no GenBank, número de acesso AB006796. O produto da amplificação foi de 406 pb.

5' ATCCGAGAGACTATTTTGTGC 3' P1pvl

5' CATCAACCTTTTTCTCACTTAC 3' P2pvl

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a metodologia de extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (2005), descrito acima.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 5 uL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), um total de 1 µL de primers, 3,5 µL de água estéril deionizada e 0,5 µL do produto da extração bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa terminou com uma extensão adicional de 10 min a 72°C e mantidos a 20°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como demonstrado no item 3.3.

### **3.7. Análise do DNA Cromossômico**

A análise do DNA cromossômico dos isolados de MRSA foi realizada segundo protocolo estabelecido nos Estados Unidos pelo CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”, Atlanta, Georgia), para tipagem molecular de *S. aureus* (McDougal et al. 2003), utilizando a técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), no qual o cromossomo bacteriano foi digerido com a enzima de restrição *Sma*I.

Uma colônia do isolado teste foi inoculado em 5 mL de caldo BHI (“Brain Heart Infusion”) e incubado a 35-37°C por 24 horas. As concentrações das suspensões celulares foram ajustadas com solução salina até atingir uma leitura de turbidez de 1,1 a 1,3. Um volume de 200 µL da suspensão de células ajustadas foi transferida para um tubo de microcentrífuga de peso conhecido,

centrifugado a 12.000 X g por aproximadamente 2 a 4 min e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. Os tubos foram novamente pesados com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células). O centrifugado foi resuspenso em 300  $\mu$ L da solução tampão Tris-EDTA (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM) e incubado a 37°C por 10 min. À esta suspensão celular foram adicionados 4  $\mu$ L de solução convencional (L 7386/Sigma, St. Louis, Mo, EUA), ou 3  $\mu$ L de solução recombinante (L 0761/Sigma) de lisostafina (1 mg/mL 20 mM de acetato de sódio, pH 4,5), e 300  $\mu$ L de gel de agarose 1,8% SeaKem Gold (FMC, Rockland, Maine, EUA) em solução tampão Tris-EDTA à 55°C. Estes pequenos blocos de gel, contendo DNA cromossômico, foram incubados por um período mínimo de quatro horas em solução EC (Tris 6 mM, ph 7,5; NaCl 1 M; EDTA 0,01 M; Brij-58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato de sódio 0,2% e 0,5% de sódio lauroylsarcosina) à 37°C. A seguir, os blocos de gel foram lavados várias vezes em solução tampão Tris-EDTA e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Os plugs foram cortados em três partes iguais e armazenados em tampão de restrição 1x por 30 min. O tampão de restrição das amostras foi removido e o DNA das amostras de *S. aureus* foi digerido com 3  $\mu$ L da enzima *Sma*I (Promega R6125, 10U/  $\mu$ L) em 200  $\mu$ L do tampão de restrição 1x, com incubação a 25°C por duas a três horas. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os fragmentos de restrição resultantes foram colocados no aparelho de eletroforese com corrente alternando de 5 a 40 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14°C durante 21 horas em gel de agarose a 1%. Os géis foram

corados com brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 20 min, descorados em água bidestilada por mais 45 min, e fotografados sob luz ultravioleta. As fotos foram digitalizadas e salvas como arquivo TIF para análise posterior.

Como padrão de peso molecular, foi utilizado o Lambda DNA ladder (New England Biolabs, EUA) na primeira e última colunas de cada gel. Além do peso molecular, foi incluída a cepa internacional de referência *S. aureus* NCTC 8325, posicionada a cada cinco ou seis amostras clínicas, em todos os géis de PFGE.

Os géis foram incluídos e processados pelo programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). As cepas de referência *S. aureus* NCTC 8325 de cada gel foram normalizadas entre si e com a cepa de referência universal NCTC 8325 (Murchan et al. 2003). Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida visualmente. O coeficiente de similaridade de Dice foi utilizado, e o dendograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (“Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages”) (Sneath and Sokal 1973). Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,8 e 2,0%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados (McDougal et al. 2003; Struelens et al. 1992).

### **3.8. Cepas de *S. aureus* Utilizadas para Controle**

Segue abaixo a relação das cepas controles utilizadas nos diversos experimentos realizados.

- Confirmação de identificação: cepa NCTC 10442, controle positivo da reação, e água destilada deionizada estéril como controle negativo.

- PCR multiplex para determinação do tipo de SCCmec, conforme protocolo desenvolvido por Zhang e colaboradores (2005): NCTC 10422 (SCCmec tipo I), N315 (SCCmec tipo II), 85/2082 (SCCmec tipo III), JCSC 1968 / CA05 (SCCmec tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (SCCmec tipo IVb), MR 108 (SCCmec tipo IVc), JCSC 4469 (SCCmec tipo IVd) e JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (SCCmec tipo V) (Ito et al. 2001;Ito et al. 2004;Ma et al. 2002;Okuma et al. 2002). Cepas controles gentilmente cedidos pelo Prof Keiichi Hiramatsu e Prof<sup>a</sup> Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão, e Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois. Como controle negativo, utilizou-se água destilada deionizada estéril.

- PCR multiplex para determinação do tipo de SCCmec, conforme protocolo desenvolvido por Milheiriço e colaboradores (2007): NCTC 10422 (SCCmec tipo I), N315 (SCCmec tipo II), 85/2082 (SCCmec tipo III), JCSC 1968 / CA05 (SCCmec tipo IVa), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (SCCmec tipo V) e HDE 288 (SCCmec tipo VI) (Ito et al. 2001;Ito et al. 2004;Ma et al. 2002;Okuma et al. 2002). Cepas controles gentilmente cedidos pelo Prof Keiichi Hiramatsu e Prof<sup>a</sup> Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão, Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois. e Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal. Como controle negativo, utilizou-se água destilada deionizada estéril.

- Detecção de produção de PVL (Panton Valentine Leukocidin): cepa controle positivo MR 108 (SCC*mec* tipo IVc). Cepa controle negativo N315 (SCC*mec* tipo II).

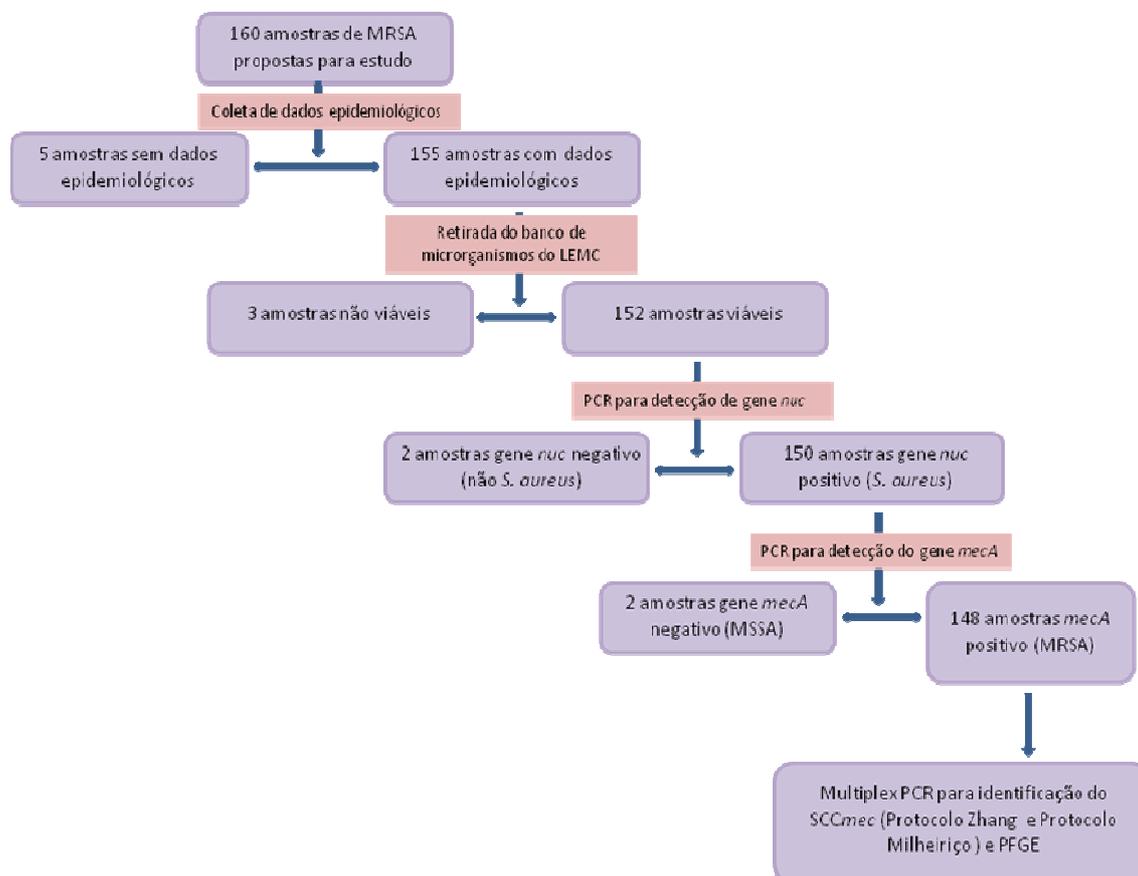
- Análise do DNA cromossômico: cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325, utilizada para normalização dos géis, gentilmente cedida pela Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal (número de acesso GenBank CP000253). Para comparação das amostras do estudo, foi realizada a análise das cepas de MRSA representantes de clones mundiais ou locais: NCTC 10422 (SCC*mec* tipo I), N315 (SCC*mec* tipo II), 85/2082 (SCC*mec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (SCC*mec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (SCC*mec* tipo IVb), MR 108 (SCC*mec* tipo IVc), JCSC 4469 (SCC*mec* tipo IVd), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (SCC*mec* tipo V), A1721/HU25 (Clone Brasileiro Epidêmico, SCC*mec* tipo III), WB72 (USA 300, SCC*mec* tipo IV), MW2 (USA 400, SCC*mec* tipo IV), WB49 (Oceania South Pacific Clone, SCC*mec* IV), HAR24 (EMRSA - 15, SCC*mec* tipo IV), HAR24 (EMRSA - 16, SCC*mec* tipo II), BK2464 (New York - Japan, SCC*mec* II), HDE288 (Clone Pediátrico / USA800, SCC*mec* IVa). Cedidos gentilmente pelo Prof Keiichi Hiramatsu e Prof<sup>a</sup> Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão; Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois; Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal; Prof. Agnes Figueiredo, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

### **3.9. Análise de Dados**

Os dados foram analisados pelos programas SPSS versão 15.0 (SSPS Inc., Chicago, IL) e Epi Info versão 3.3 (CDC, Atlanta, GA, USA). Inicialmente gráficos-caixa foram produzidos para as variáveis contínuas com o objetivo de identificar a presença de valores extremos da distribuição (“outliers”), os quais foram retirados da amostra. Diferenças entre proporções foram avaliadas pelo teste do chi-quadrado ou Fisher, quando apropriado. Diferenças entre médias foram testadas pelo teste t ou ANOVA quando pertinente. Prevalências e respectivos intervalos de 95% de confiança (IC95%) foram calculados. Estimativas de risco relativo (Odds Ratio/OR) e respectivos IC95% foram calculados por meio de regressão logística. As variáveis com valor de  $p < 0,10$  na análise univariada foram incluídas na análise multivariada para identificar os fatores independentemente associados ao óbito pelas amostras contendo SCCmec III, possivelmente associadas ao CEB. Um nível de probabilidade de 0,05 foi usado para determinar a significância estatística. Todos os valores de "p" utilizados foram bicaudais. Para a análise da curva de sobrevida, utilizou-se o teste de Kaplan-Meier com teste de diferença por Log Rank (Kaplan & Méier, 1958). A sobrevida atuarial foi obtida por tábua de sobrevida.

#### 4. RESULTADOS

Um total de 160 amostras de MRSA foram inicialmente selecionadas (Figura 1), das quais 5 amostras foram excluídas uma vez que não foi possível obter todos os dados epidemiológicos selecionados nos prontuários. Devido à dificuldade de reaver prontuários antigos para a coleta de dados, a amostragem dos anos de 2002 e 2003 ficou reduzida quando comparadas aos outros dois anos do estudo (2004 e 2005).



**Figura 1.** Fluxograma das 160 amostras de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina do período de 2002 a 2005 selecionadas para estudo.

Das 155 amostras que foram analisadas por técnicas moleculares, duas amostras demonstraram resultados negativos para o gene *nuc* e duas amostras não apresentaram resistência à oxacilina (*mecA* negativo). Outras três amostras não foram viáveis decorrente do armazenamento e/ou contaminação no processo de estocagem.

A análise dos resultados incluiu somente as amostras que foram consideradas *S. aureus* e que possuíam gene *mecA*. Sendo assim, um total de 148 amostras foram incluídas para os estudos posteriores (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distribuição anual das amostras de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina isoladas de hemocultura do Hospital São Paulo no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005.

Ano de Estudo	Número de Amostras	Porcentagem (%)
2002	23	15,5
2003	38	25,7
2004	44	29,7
2005	43	29,1
Total	148	100,0

#### 4.1. Análise Epidemiológica

Na análise epidemiológica de todas as amostras a média de idade dos 148 pacientes foi de 52,4 anos (DP = 22,2) e a mediana de 56,5 (Tabela 5). O sexo masculino foi predominante, com 63,5% dos casos.

**Tabela 5.** Características epidemiológicas de 148 pacientes com bacteremia causada por MRSA no período de 2002 a 2005.

Características	Total n=148 (%)
<b>Idade (anos)</b>	
Média [DP]	52,6 [22,2]
Mediana	56,5
<b>Sexo</b>	
Masculino	94 (63,5)
Feminino	54 (36,5)
<b>Admissão em UTI</b>	79 (53,4)
<b>Dias de hospitalização até bacteremia - média [DP]*</b>	18,86 [14,99]
<b>Sepse</b>	96 (64,9)
<b>Infecção relacionada à assistência à saúde</b>	137 (92,6)
<b>Fonte da infecção</b>	
Primária ou associada a catéter	57 (38,5)
Pulmonar	52 (35,1)
Ferida cirúrgica	17 (11,5)
Pele	13 (8,8)
Gastrointestinal	9 (6,1)
<b>Uso de antimicrobianos antes do diagnóstico da infecção</b>	
Vancomicina	23 (15,4)
Clindamicina	15 (10,1)
Aminoglicosídeos	14 (9,4)
Ciprofloxacina	14 (9,4)
Metronidazol	13 (8,7)
Claritromicina	8 (5,4)

	Polimixina	6 (4,0)
	Trimetoprim/Sulfametoxazol	5 (3,3)
<u>β-lactâmicos</u>		73 (49,3)
	Cefepima	32 (21,6)
	Ceftriaxona	29 (19,6)
	Imipenem	9 (6,0)
	Ampicilina	8 (5,4)
<b>Procedimentos cirúrgicos prévios</b>		72 (48,6)
<b>Ventilação mecânica</b>		54 (36,5)
<b>Presença de catéter venoso central</b>		110 (74,3)
<b>Presença de catéter urinário</b>		60 (40,5)
<b>Presença de catéter venoso periférico</b>		60 (40,5)
<b>Transplante</b>		8 (5,4)
<b>Diálise</b>		38 (25,7)
<b>Internação prévia</b>		77 (52,0)
<b>Óbito</b>		77 (52,0)
	Óbito relacionado à bacteremia	48 (32,4)

\*Valor da média corrigida após exclusão de valores “outliers”  $\geq 66$  dias.

As bacteremias foram relacionadas à assistência à saúde na maioria dos casos (92,6%). Infecções primárias ou associadas a catéter (38,5%) e infecções pulmonares (35,1%), foram as principais fontes de isolamento de MRSA.

A presença de fatores de risco em ordem decrescente de prevalência foi: catéter central (74,3%), procedimentos cirúrgicos prévios (48,6%), catéter urinário (40,5%), catéter periférico (40,5%), ventilação mecânica (36,5%), diálise (25,7%) e transplante (5,4%).

A maioria dos pacientes utilizou previamente algum antibiótico, sendo os  $\beta$ -lactâmicos cefepima e ceftriaxona os mais freqüentemente administrados.

A terapia antimicrobiana após identificação do patógeno na hemocultura foi considerada adequada (uso de glicopeptídeos ou outro antimicrobiano específico para MRSA) na maioria dos 148 casos (83,1%; dados não mostrados).

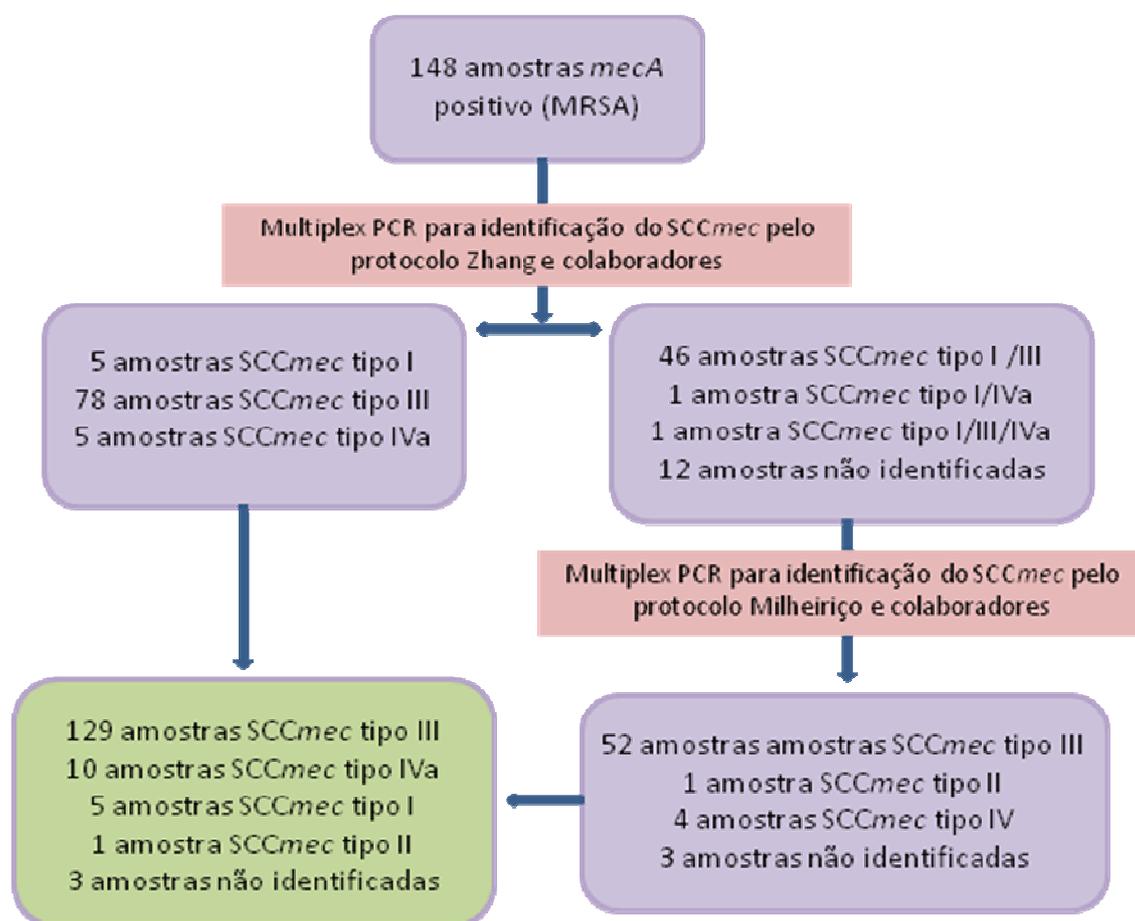
#### **4.2. Caracterização Genética das Amostras**

Todas as 148 amostras de MRSA testadas nos protocolos de identificação do SCC*mec* apresentaram PCR positivos para a presença do genes *nuc* e *mecA*.

Os resultados de SCC*mec* das amostras, processadas pelos dois protocolos multiplex, encontram-se descritos na Figura 2. Utilizando-se inicialmente o protocolo de PCR multiplex de Zhang e colaboradores (2005), 78 amostras amplificaram para o SCC*mec* III, 5 amplificaram para o SCC*mec* I e outras 5 amplificaram para SCC*mec* subtipo IVa. Outras 48 amostras apresentaram bandas múltiplas (amplificaram para mais de um tipo de SCC*mec*), sendo bandas compatíveis para: (i) SCC*mec* tipo I e III; (ii) SCC*mec* I, III e IVa, e (iii) SCC*mec* I e IVa.

As amostras com bandas múltiplas e as não identificadas pelo protocolo de Zhang e colaboradores (2005) foram submetidas ao protocolo de PCR multiplex de Milheiriço e colaboradores (2007). Todas as amostras que apresentavam anteriormente bandas múltiplas para tipos I e III foram identificadas como SCC*mec* tipo III. As duas amostras que continham bandas para SCC*mec* tipo I, III e IVa e I e IVa não foram identificadas. Com relação às 12 amostras não identificadas no protocolo de Zhang, seis delas apresentaram

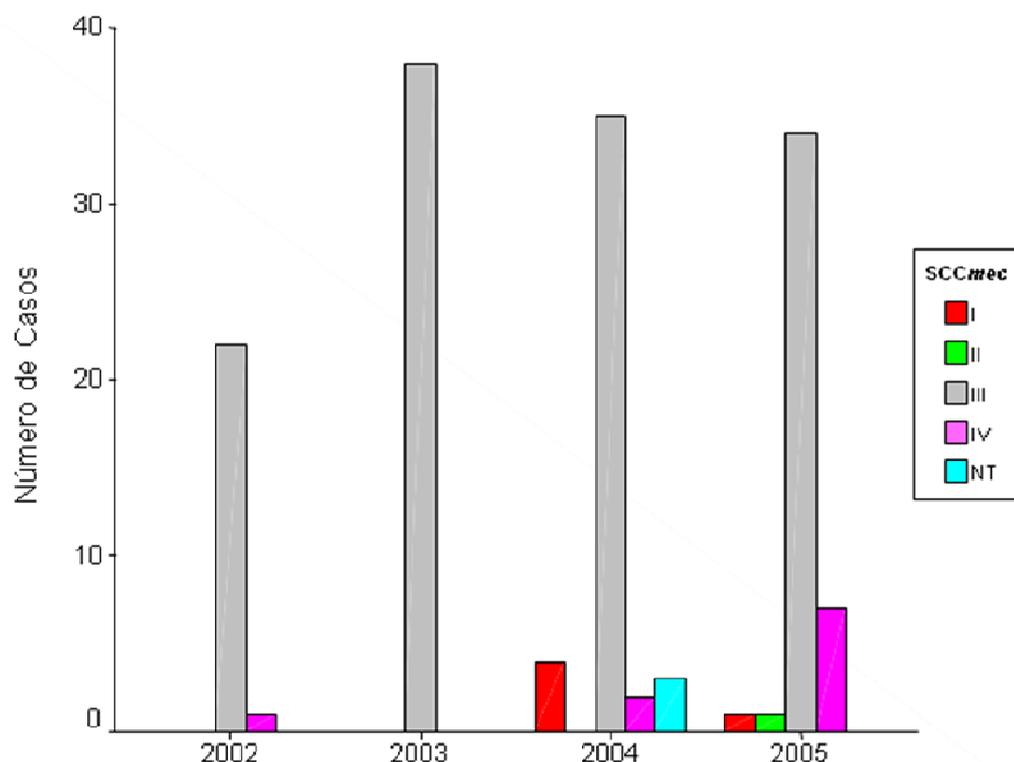
perfil de SCCmec tipo III, 4 de tipo IV, uma de tipo II e uma não teve o SCCmec identificado.



**Figura 2.** Fluxograma da identificação do SCCmec das 148 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina selecionadas para estudo.

As amostras que apresentaram SCCmec tipo IV foram submetidas a PCR para detecção do gene responsável pela produção de PVL. Das 10 amostras testadas, apenas uma demonstrou ter o gene codificador desta toxina.

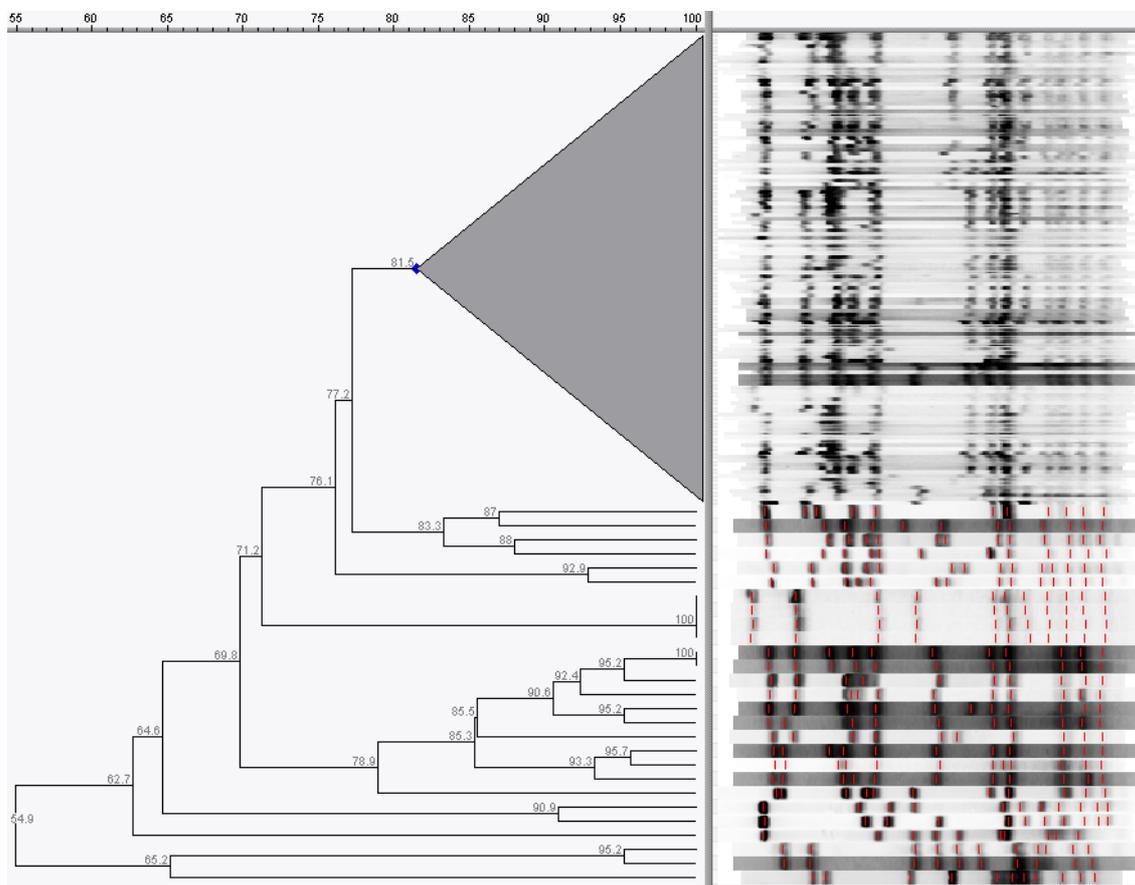
Observou-se uma variação nas porcentagens de distribuição do tipo de SCCmec de acordo com os anos avaliados (Figura 3). Em 2002 e 2003, o SCCmec tipo III foi predominante (95,6% em 2002 e 100% em 2003), dentre 23 e 38 amostras, respectivamente. Somente uma das 23 amostras analisadas do ano de 2002 pertencia ao SCCmec tipo IV. Em 2004, 79,5% pertenciam ao SCCmec tipo III, 9,0% pertenciam ao SCCmec tipo I e 4,5% ao SCCmec tipo IV. No ano de 2005, 79,1% das 43 amostras pertenciam ao SCCmec tipo III, 16,3% pertenciam ao SCCmec tipo IV. Somente uma amostra (2,3%) pertencia ao SCCmec tipo I e uma amostra ao SCCmec tipo II neste ano.



**Figura 3.** Gráfico da distribuição das 148 amostras de MRSA analisadas de acordo com o tipo de SCCmec no período de 2002 a 2005.

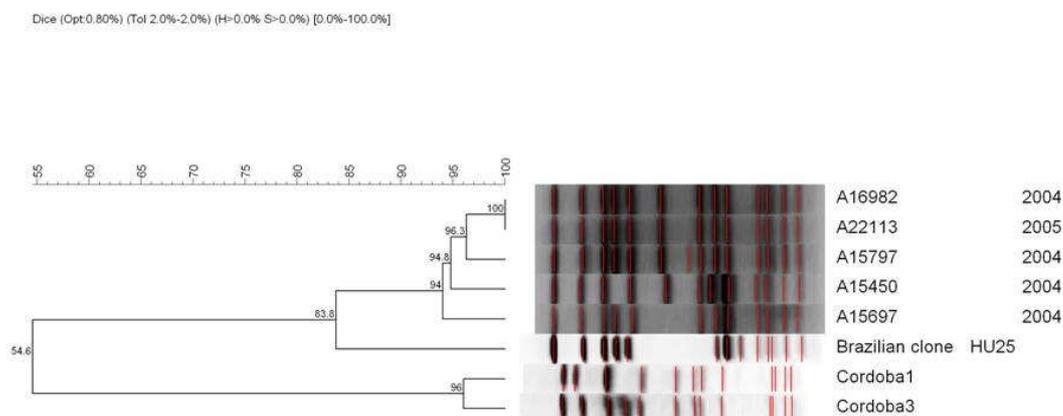
### 4.3. Tipagem Molecular

Todas as 148 amostras foram submetidas à técnica de PFGE e analisadas com o programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A análise do perfil do DNA cromossômico identificou quatro principais clusters com mais de 80% de similaridade pelo coeficiente de Dice, sendo que 128 amostras foram reunidas em um único cluster (Figura 4).



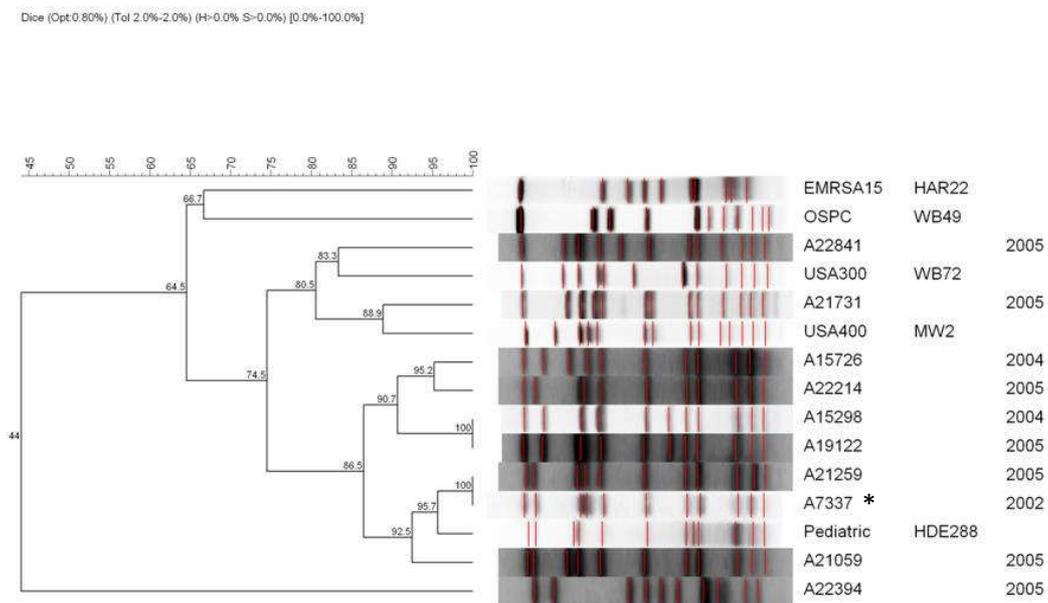
**Figura 4.** Dendrograma de similaridade genética entre 148 isolados de MRSA de acordo com padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice. Amostras com mais de 80% de similaridade, relacionadas ao clone epidêmico brasileiro, foram colapsadas no triângulo invertido.

Estas últimas relacionaram-se geneticamente ao perfil da cepa HU25, representante do CEB. Dentro do cluster que envolveu o CEB, observa-se a presença de seis “sub-clusters” com mais de 90% de similaridade. A maioria destas amostras portavam *SCCmec* tipo III, porém as cinco amostras tipo I e duas das três amostras que não tiveram o *SCCmec* identificado também foram agrupadas neste mesmo cluster. Outras quatro amostras que carregavam *SCCmec* tipo III, obtiveram 100% de similaridade entre si e não foram relacionadas com nenhum clone pré-existente (Figura 4). A análise do dendograma somente com amostras portando *SCCmec* tipo I revelou que as mesmas não possuíam nenhuma similaridade com o clone *SCCmec* I recentemente denominado como Chile/Córdoba (Figura 5).



**Figura 5.** Análise de clusters das amostras contendo *SCCmec* tipo I com clones Chile/Córdoba e epidêmico brasileiro, utilizando coeficiente de Dice e método de UPGMA. O ano de isolamento de cada amostra está localizado no lado direito da figura.

Um outro cluster (Figura 6) que reuniu a maioria das amostras de MRSA SCCmec tipo IV apresentou um perfil similar à amostra HDE288, representante do clone pediátrico. Duas outras amostras SCCmec tipo IV foram correlacionadas às linhagens USA300 e USA400 (Figura 6).



**Figura 6.** Comparação dos isolados SCCmec IV com representantes de clones internacionais contendo SCCmec tipo IV, utilizando coeficiente de Dice e método de UPGMA.

\*: Resultado positivo para detecção de produção de PVL. O ano de isolamento de cada amostra está localizado no lado direito da figura.

#### **4.4. Fatores de risco para hemocultura positiva por MRSA SCCmec tipo III versus SCCmec não tipo III**

Os fatores de risco dos pacientes para aquisição de MRSA foram avaliados utilizando-se análises univariada e multivariada, comparando-se o SCCmec tipo III (relacionado ao CEB) versus os outros tipos de SCCmec encontrados.

Na análise univariada (Tabela 6), dentre os fatores de risco estudados, observa-se diferença estatisticamente significativa somente para antibioticoterapia prévia (OR = 0,35; IC 95%: 0,13 – 0,95; p= 0,045). Todos os outros fatores de risco como permanência em UTI, ventilação mecânica e procedimentos cirúrgicos prévios não foram de significância estatística.

**Tabela 6.** Avaliação dos fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA pela análise univariada.

Fatores de Risco	Tipo de SCCmec		OR	IC 95%		p	
	III 129 (%)	Outros 19 (%)					
Sexo masculino	85 (65,9)	9 (47,4)	0,47	0,18	1,23	0,117	
Internação Prévia	69 (53,5)	8 (42,1)	0,63	0,24	1,68	0,354	
Esteve em UTI	68 (52,7)	11 (57,9)	1,23	0,47	3,27	0,673	
Sepse	86 (66,7)	10 (52,6)	0,56	0,21	1,47	0,232	
Óbito nesta internação	62 (48,1)	9 (47,4)	0,97	0,37	2,55	0,955	
Infecção Hospitalar	121 (93,8)	17 (89,5)	0,56	0,11	2,87	0,376	
Fonte	primária ou associada a catéter	49 (37,9)	8 (42,1)	1			
	pulmonar	47 (36,4)	5 (26,3)	1,53	0,41	5,89	0,67
	outras*	33 (25,6)	6 (31,6)	0,9	0,25	3,26	
Antibioticoterapia Prévia	103 (79,8)	11 (57,9)	0,35	0,13	0,95	0,045	
Procedimento Cirúrgico Prévio	63 (48,83)	9 (47,4)	0,94	0,36	2,47	0,905	
Ventilação Mecânica	47 (36,4)	7 (36,8)	1,02	0,37	2,76	0,972	
Catéter Central	99 (76,7)	11 (57,9)	0,42	0,15	1,13	0,093	
Catéter Urinário	53 (41,1)	7 (36,8)	0,84	0,31	2,27	0,725	
Transplante	7 (5,4)	1 (5,3)	0,97	0,11	8,34	0,976	
Diálise	34 (26,3)	4 (21,0)	0,75	0,23	2,4	0,615	
Outros Fatores de Risco	29 (22,5)	5 (26,3)	1,23	0,41	3,71	0,714	

\* ferida cirúrgica, gastrointestinal, pele.

Para a análise multivariada, foram incluídas somente as variáveis com valor de  $p < 0,1$  (catéter central e antibioticoterapia prévia). Quando essas variáveis foram ajustadas na análise multivariada (Tabela 7), observou-se que catéter central (OR = 0,46; IC 95%: 0,17 – 1,28;  $p = 0,14$ ) foi uma variável de confusão para antibioticoterapia prévia (OR = 0,38; IC 95%: 0,14 – 1,05;  $p = 0,063$ ).

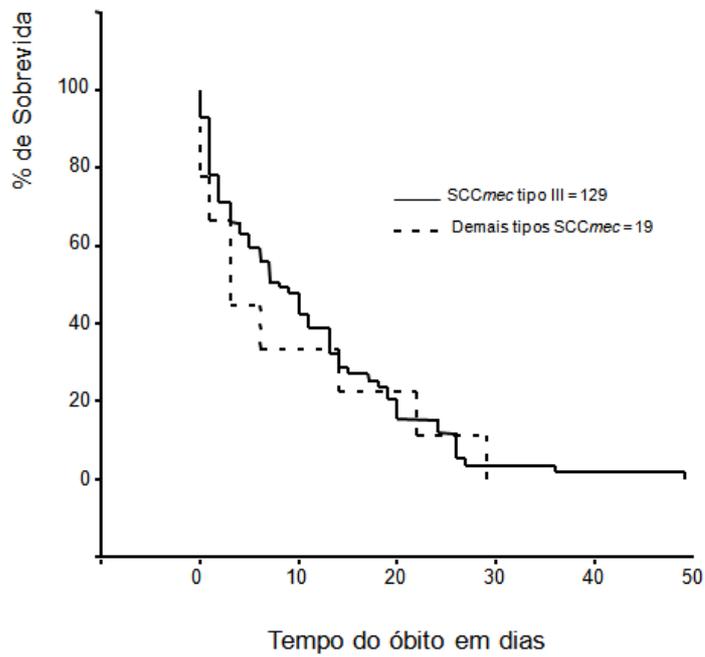
**Tabela 7.** Avaliação dos fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA carreando diferentes tipos de SCCmec pela análise multivariada.

Variáveis	Tipo de SCCmec		OR ajustado	IC 95%	p	
	Tipo III	Outros				
	129 (%)	19 (%)				
<b>Uso de antibiótico prévio</b>						
Não	26 (76,47)	8 (23,53)	0,38	0,14	1,05	0,063
Sim	103 (90,35)	11(9,65)				
<b>Exposição a catéter central</b>						
Não	30 (78,9)	8 (21,1)	0,46	0,17	1,28	0,138
Sim	99 (90,0)	11 (10,0)				

Com relação à distribuição do SCCmec tipo III dentro do HSP, não foi possível estabelecer uma correlação de acordo com a unidade de internação. No entanto, as cinco amostras tipo I e 31,7% das amostras tipo III foram identificadas em UTIs. Quatro das 10 amostras de SCCmec tipo IV foram isoladas de pacientes internados em unidades pediátricas. Apenas 3% das amostras tipo III foram identificadas em pacientes pediátricos (dados não mostrados).

#### **4.5. Análise de sobrevida dos pacientes com bacteremia provocada pelo MRSA SCCmec tipo III versus SCCmec não tipo III**

A sobrevida atuarial aos 14 dias foi de 33,3% para indivíduos infectados com SCCmec III e 22,2% para os demais tipos de SCCmec. A sobrevida média dos pacientes com o tipo III, quando determinada pelo método Kaplan-Meier e testada por Log Rank, mostrou-se similar estatisticamente ( $p=0,329$ ) à de indivíduos com demais tipos de SCCmec. A curva de sobrevida atuarial (Kaplan-Meier) apresentou média de 12,9 dias (erro padrão = 1,67), variando de 13,5 (erro padrão = 1,83) e 8,6 (erro padrão = 3,53), respectivamente para infecções pelo SCCmec tipo III e demais SCCmec (Figura 7). Valores acima de 63 dias foram desconsiderados nesta análise.



**Figura 7.** Curva de sobrevida atuarial (Kaplan-Meier) dos pacientes com bacteremia pelo SCCmec tipo III comparada às bacteremias causadas pelos demais tipos de SCCmec.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo permitiu a avaliação dos possíveis fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA causada por diferentes linhagens presentes no complexo UNIFESP/HSP. Considerando-se a escassez de conhecimento sobre a epidemiologia molecular de bacteremias por MRSA na realidade brasileira, este estudo adicionou os seguintes dados: (i) a persistência do clone epidêmico brasileiro dentro do ambiente hospitalar; (ii) a emergência de novos clones, diferentes do CEB, no HSP nos últimos anos avaliados; (iii) a utilização de antibioticoterapia prévia como fator de risco para bacteremia por *SCCmec* tipo III; (iv) a semelhança das taxas de sobrevida dos pacientes analisados no decorrer dos anos do estudo, independente do tipo de *SCCmec*.

### Evolução molecular do CEB no UNIFESP/HSP

O estudo de Conterno, realizado na mesma instituição, mostrou que 86% das amostras de MRSA de hemoculturas na década de 90 pertenciam ao CEB, distribuídas entre 3 subtipos deste clone (Conterno, 1999). De acordo com os relatos de trabalhos brasileiros mais recentes, nos quais observou-se a diminuição do CEB, nossa hipótese era a de que a frequência de infecções por este clone estaria diminuindo em nosso meio também. Portanto, um dos objetivos primordiais deste trabalho consistia na identificação de amostras *SCCmec* tipo III (predominantemente o Clone Epidêmico Brasileiro) dentre amostras isoladas de hemoculturas do Hospital São Paulo.

Encontramos, no presente estudo, a maioria das amostras de hemoculturas causadas por MRSA pertencentes ao tipo III. Como este genótipo

está estreitamente associado ao CEB, verificamos que não houve uma diminuição significativa desta linhagem clonal CEB neste período. Estes dados, obtidos por PCR multiplex, foram corroborados pelos resultados do PFGE, no qual 86% das amostras pertenciam a um único cluster relacionado a este clone. Apesar da predominância do CEB, verificamos também uma grande diversidade de “subtipos” desta linhagem dentre as amostras avaliadas, ao contrário do estudo anterior realizado por Conterno (Conterno, 1999). Este fenômeno foi também recentemente observado por Trindade (2005) em amostras de hemocultura do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e por Andrade (2008) no HSP em diversos sítios de infecção. Esta diversidade pode indicar a evolução temporal deste clone nestes ambientes nosocomiais.

A persistência do CEB em amostras invasivas de MRSA é preocupante. De acordo com os trabalhos conduzidos por Miranda e colaboradores, este clone teria algumas vantagens adaptativas, como maior capacidade de produzir biofilme, aderir e invadir as vias respiratórias (de Miranda et al. 2007). Estas características podem ter contribuído, em parte, para a continuidade desta linhagem no HSP, desde a sua primeira descrição no Brasil em 1993 (Sader et al. 1993).

O Hospital São Paulo, onde foi realizado este estudo, é uma instituição terciária, sendo referência em atendimento de pacientes de alta complexidade. O aumento de procedimentos invasivos na prática clínica, tais como uso de cateteres e procedimentos cirúrgicos, também poderia auxiliar na disseminação deste clone, dadas as suas características adaptativas descritas anteriormente. Além disso, a capacidade deste clone de carrear um maior número de genes

de resistência a antimicrobianos frente às outras linhagens já descritas em nosso país, faz com que este persista em ambientes de alta pressão seletiva, pelo uso de diversas classes de antimicrobianos (Haddadin et al. 2002). Estudos adicionais realizados em hospitais de menor complexidade no Brasil seriam necessários para verificar se este clone também é predominante em infecções de corrente sanguínea causadas por MRSA.

#### Emergência de outras linhagens de MRSA no complexo UNIFESP/HSP

Adicionalmente, durante os quatro anos avaliados no presente estudo, observou-se o surgimento de amostras portadoras de SCC*mec* tipos I, II e IV principalmente nos últimos dois anos analisados (2004 e 2005). É difícil precisar o momento exato no qual se iniciou este fenômeno, porém resultados obtidos por um estudo realizado em nossa instituição (Andrade, 2008) e por dados preliminares do projeto SCOPE – Brasil, coordenado pelo nosso laboratório em hospitais brasileiros (dados não publicados), corroboram a hipótese de que esta mudança se acentuou nos últimos cinco anos.

O estudo de Andrade avaliou amostras do período de 1997 a 2006 de sete centros médicos participantes do programa SENTRY localizados em três países na América Latina - Brasil, Argentina e Chile. Tanto nas amostras provenientes do HSP quanto do restante das outras localidades, representantes do tipo IV foram predominantemente isolados após o ano de 2000. O projeto SCOPE processou, até o momento, 15 isolados clínicos de MRSA provenientes de hemoculturas coletadas em 2007 em hospitais paulistanos, das quais seis de pacientes do complexo UNIFESP/HSP. Dentre as seis amostras, três pertenciam ao SCC*mec* tipo II e eram relacionados ao

clone Nova Iorque/ Japão e duas amostras pertenciam ao SCC*mec* tipo IV, relacionadas também ao clone pediátrico. Estes clones também foram encontrados nas amostras dos demais hospitais avaliados (dados não publicados).

Outro ponto de relevância neste trabalho foram as 10 amostras de SCC*mec* tipo IV. Diferentemente dos MRSA identificados nas cidades de Porto Alegre e Rio de Janeiro (Ribeiro et al. 2005; Ribeiro et al. 2007), associados aos clones USA300, USA400 e OSPC, os isolados do HSP foram predominantemente relacionados ao clone pediátrico. Apenas duas amostras foram geneticamente relacionadas aos clones USA300 e USA400.

Isolados portando SCC*mec* IV são comumente relacionados a amostras provenientes da comunidade (Fey et al, 2003). O clone pediátrico, apesar de possuir SCC*mec* tipo IV, é uma exceção à regra, pois foi descrito primeiramente como uma linhagem hospitalar em Portugal (Sa-Leão et al., 1999). A presença de quatro amostras com SCC*mec* tipo IV, relacionadas a crianças internadas em unidades da pediatria, reforça os dados obtidos em outros estudos, nos quais observou-se menores médias de idade dos pacientes portando SCC*mec* tipo IV (Trindade et al., 2005; Andrade 2008). No estudo de Trindade e colaboradores, vários dos pacientes infectados por MRSA com SCC*mec* tipo IV estavam internados em unidades neonatais. A média de idade dos pacientes infectados por SCC*mec* tipo IV no estudo de Andrade era significativamente menor que os infectados por tipos I e III (Andrade, 2008). Assim como em Portugal, estes dados indicariam que o clone pediátrico estaria intimamente ligado a populações jovens, talvez relacionado às características mais rigorosas da política do uso racional de antimicrobianos nestas unidades,

como sugerido pelos pesquisadores portugueses (Sa-Leão et al., 1999). Este ambiente, de menor pressão seletiva e baixa rotatividade de pacientes, auxiliaria na disseminação e manutenção de linhagens específicas - no caso, o clone pediátrico - nestas unidades.

Dentre os dez MRSA com tipo IV, apenas um foi positivo para produção de PVL. O estudo caso controle realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo por Vidal, que avaliou 33 casos de pacientes com bacteremia por MRSA SCCmec IV no período de 2002 a 2003, também não detectou a presença de PVL em nenhuma das amostras (Vidal, 2007). Apesar de não terem sido comparados com o clone pediátrico por nenhum método de tipagem molecular, a ausência de PVL e a realização deste trabalho em um hospital universitário na mesma localização geográfica do presente estudo (cidade de São Paulo), indica que estas amostras podem estar relacionadas também ao clone pediátrico.

A amostra do HSP positiva para o gene produtor de PVL foi isolada de um paciente de 77 anos internado na enfermaria de pneumologia, o qual não recebeu tratamento específico para MRSA. Apesar de não ter evoluído para choque séptico, o óbito do paciente foi claramente associado à bacteremia por MRSA

Os dois pacientes dos quais foram isolados os perfis USA300 e USA400 tinham menos de 30 anos de idade, o primeiro com 29 dias de idade e infecção considerada não hospitalar (parto não realizado no HSP), e o segundo com 10 dias de idade e infecção considerada hospitalar (parto realizado no HSP). É interessante notar que o recém nascido que não recebeu tratamento com vancomicina, infectado por USA300, foi a óbito em 48 horas. As duas amostras

foram negativas para PVL. Estes dados sugerem que, apesar de pouco freqüente, outros tipos clonais contendo *SCCmec* IV possam estar emergindo como causa de bacteremia na cidade de São Paulo.

Curiosamente, as amostras *SCCmec* tipo I do presente estudo não foram relacionadas ao clone Chile/Córdoba, descrito na Argentina e Chile e portador de *SCCmec* tipo I (Sola et al. 2002), Andrade atribuiu a maior parte das 23 amostras tipo I encontradas na Argentina e Chile ao clone Chile/Córdoba, porém não foram encontrados representantes desta linhagem no Brasil (Andrade, 2008). Por estarmos diante de um *SCCmec* diferente do comumente relacionado ao CEB e considerando-se que o *SCCmec* destas amostras foram identificadas somente pelo protocolo de multiplex de Zhang e colaboradores (2005), novos estudos moleculares nessas amostras são recomendados para confirmação destes resultados.

#### Mudanças no perfil epidemiológico de bacteremias por MRSA em nossa instituição

Nosso estudo proporcionou a comparabilidade com dados de estudo anterior, desenvolvido também no HSP na década de 90 (Conterno 1999). Para melhor avaliação dos mesmos, construímos uma tabela com os resultados dos fatores de risco dos dois trabalhos, e calculamos as diferenças entre as taxas obtidas (Tabela 8). A tabela foi estratificada de acordo com o período do estudo: Período 1 (1995-1996) (Conterno 1999) e Período 2 (estudo atual). Pudemos observar que em muitos pontos não houve diferenças significantes em relação aos fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA. A média de idade manteve-se semelhante (49,1 no Período 1 e 52,6 no Período

2), assim como a porcentagem de pacientes do sexo masculino (60,8% no Período 1 e 63,5% no Período 2). A média de dias de hospitalização até a bacteremia por MRSA também se manteve estável. Porém, ao se comparar as taxas de infecções relacionadas à assistência à saúde, observa-se um aumento significativo no segundo período. Com relação às fontes de infecção, observa-se que houve mais bacteremias primárias ou relacionadas a catéter também no segundo período, havendo um aumento de 13,1% para 38,5%.

Outro ponto interessante nesta comparação foi com relação às porcentagens praticamente idênticas ao uso prévio de antimicrobianos (76,8% no Período 1 versus 77,0% no Período 2). Embora a utilização adequada de antimicrobianos tenha sido maior no segundo período, esta diferença não foi estatisticamente significativa. As taxas de mortalidade permaneceram elevadas nos dois períodos.

**Tabela 8.** Comparação de bacteremias por MRSA no período 1995-1996 e 2002 - 2005 no Hospital São Paulo.

	1995 - 1996	2002 - 2005	
<b>Características</b>	<b>total n=69 (%)</b>	<b>total n=148 (%)</b>	<b>p*</b>
<b>Idade (anos)</b>			
Média ( DP)	49,14 (19,08)	52,6 (22,2)	
<b>Sexo</b>			
masculino	42 (60,8)	94 (63,5)	0,708
feminino	27 (39,2)	54 (36,5)	
<b>Dias de hospitalização até bacteremia por MRSA - média</b>			
	18,8	18,86	
<b>Infecção relacionada à assistência à saúde</b>			
	58 (84,1)	137 (92,6)	0,053
<b>Fonte da infecção</b>			
primária ou associada a catéter	9 (13,1)	57 (38,5)	< 0,001
pulmonar	19 (27,5)	52 (35,1)	0,267
outros	24 (34,8)	39	0,203
<b>Uso de antimicrobianos antes do diagnóstico da infecção por MRSA</b>			
	53 (76,8)	114 (77,0)	0,972
<b>Procedimentos cirúrgicos prévios</b>			
	16 (23,2)	72 (48,6)	< 0,001
<b>Tratamento</b>			
adequado	52 (75,4)	123 (83,1)	0,179
inadequado	17 (24,6)	25 (16,9)	
<b>Óbito</b>			
	29 (42,0)	77 (52,0)	0,17

\*Cálculos realizados no programa MINITAB versão 14 (Minitab Inc, State College, USA).

---

---

Análise dos fatores de risco para aquisição de bacteremia por MRSA segundo tipo de SCCmec.

Optamos pela análise das 148 amostras de MRSA estratificada em dois grupos: SCCmec tipo III e outros SCCmec, visto que a quantidade de isolados não pertencentes ao SCCmec tipo III era de apenas 19. Esta abordagem também foi usada por Davis (Davis et al. 2006), que agrupou as amostras de MRSA em dois grupos distintos: SCCmec II/III e SCCmec IV.

A maioria das infecções pelos tipos III e não tipo III foi maior no sexo masculino. Estes dados estão de acordo com estudo realizado por Cho e colaboradores, no qual mais de 70% das infecções dos tipos III e IV foram identificadas no sexo masculino (Cho et al. 2006). No entanto, nenhum estudo faz menção de hipóteses consistentes para estas taxas.

Identificamos o uso prévio de antimicrobianos, em especial os  $\beta$ -lactâmicos, como fator de risco para bacteremias por SCCmec III. Esta classe de drogas possui amplo espectro, sendo capaz de selecionar linhagens mais resistentes de MRSA, contendo mais determinantes de resistência inseridos em seu cassete cromossômico. Apesar de diversos estudos terem relacionado previamente bacteremias por MRSA ao uso de antimicrobianos (Shorr 2007; Tacconelli et al. 2008), poucos avaliaram se havia correlação entre o tipo específico de SCCmec e/ou "sequence typing". Os únicos três relatos desenhados para esta finalidade foram conduzidos nos Estados Unidos (Davis et al. 2006; Seybold et al. 2006) e Coréia (Cho et al. 2006), porém somente um utilizou amostras exclusivamente de hemoculturas.

O estudo conduzido por Davis e colaboradores avaliou 100 pacientes infectados por MRSA, estratificando-os após a análise molecular em dois

grupos: (i) *SCCmec* II e *SCCmec* III e (ii) *SCCmec* IV. Apesar do uso de antibioticoterapia prévia não ter sido considerado um dos fatores de risco para infecção pelo tipo III, apenas 22 dos 100 pacientes tinham bacteremia por MRSA. Os demais pacientes tinham infecções por MRSA em outros sítios como pele e trato respiratório (Davis et al. 2006).

O trabalho desenvolvido por Seybold e colaboradores comparou os fatores de risco para bacteremia pelo clone USA300, *SCCmec* IV, com outros clones predominantes na região, como o USA100 e USA500 (Seybold et al. 2006). Dentre outros, os autores identificaram o uso de antimicrobianos nos últimos 12 meses como um dos fatores associados à aquisição do USA300, em comparação às demais linhagens. Entretanto, nenhuma amostra do CEB foi incluída neste estudo, dificultando a comparabilidade com nossos resultados.

Cho e colaboradores estudaram amostras de múltiplos sítios de infecção pela técnica de MLST, com dois STs predominantes, classificados como ST239 (relacionado ao CEB), e ST5 (relacionado ao Nova Iorque/Japão) (Cho et al. 2006). Os pacientes infectados com MRSA ST239 fizeram uso prévio de antibióticos por maior tempo que o grupo com ST5, o que foi considerado um fator de risco para aquisição desta linhagem. O estudo caso-controle realizado por Vidal, na cidade de São Paulo, comparou fatores de risco para bacteremias causadas por MRSA portando *SCCmec* IV versus outros tipos de *SCCmec*. Neste trabalho observou-se que pacientes infectados por MRSA tipo IV eram predominantemente crianças menores de um ano, que tiveram também menor frequência de uso de antibióticos (Vidal, 2007).

Entretanto, no presente estudo, o uso prévio de antibióticos não continuou estatisticamente significativo ( $p = 0,063$ ) após análise multivariada.

Este fenômeno talvez possa ser atribuído a um número reduzido de amostras com *SCCmec* diferente do tipo III utilizado para análise dos fatores de risco. A continuação deste trabalho, incluindo um maior número de amostras de bacteremias por MRSA, poderá ratificar esta hipótese.

O uso de catéter venoso central é um fator de risco freqüentemente citado para infecções por MRSA. Entretanto, o mesmo não estava associado em nossa amostragem à infecção por nenhum dos dois grupos de *SCCmec*. É provável que o uso deste dispositivo invasivo esteja associado portanto à bacteremias por MRSA, independente do tipo de cassete cromossômico carregado pelo patógeno.

#### Taxas de sobrevida de acordo com o tipo de *SCCmec*

Em relação à mortalidade, esperava-se que a emergência de outros tipos de *SCCmec*, como o tipo IV, poderia alterar as taxas de óbito ao longo dos anos. O tipo IV conhecidamente produz toxinas relacionadas a complicações clínicas graves, como pneumonia necrotizante. Entretanto, não se observou, entre os dois grupos analisados, diferenças entre a mortalidade dos pacientes infectados. Este fato pode estar relacionado ao tipo clonal específico de *SCCmec* IV em nosso meio, pertencente predominantemente ao clone pediátrico. Ao contrário das outras linhagens clonais tipo IV, representantes de MRSA do clone pediátrico geralmente não carregam a toxina PVL. Estes resultados, portanto, devem ser interpretados de acordo com o perfil de epidemiologia molecular dos isolados de MRSA da região geográfica brasileira em questão. Seria interessante conduzir estudo semelhante em outras localidades brasileiras nas quais já foram relatados casos de infecção

por outras linhagens do tipo IV produtoras de PVL (Melo et al. 2004;Ribeiro et al. 2007).

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ A maioria das amostras de bacteremias por MRSA no HSP continham *SCCmec* III e foram relacionadas geneticamente ao CEB. Outras linhagens clonais foram detectadas portando *SCCmec* I e IV.
  
- ✓ As amostras que continham *SCCmec* tipo IV foram relacionadas geneticamente ao clone pediátrico e aos clones USA300 e USA400, esses últimos em pacientes de unidade neonatal. Apenas uma amostra de *SCCmec* tipo IV, relacionado ao clone pediátrico, foi produtora de PVL.
  
- ✓ Antibioticoterapia prévia, pela análise multivariada, foi considerado o único fator de risco para aquisição de bacteremia por *SCCmec* III em nosso meio.
  
- ✓ A emergência de novas linhagens de MRSA não interferiu nas taxas de sobrevida dos pacientes com hemoculturas positivas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2004) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* **32**, 470-485.

Aires de,S.M., Crisostomo,M.I., Sanches,I.S., Wu,J.S., Fuzhong,J., Tomasz,A. and de,L.H. (2003) Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 159-163.

Aires de,S.M., de,L.H., Santos,S., I, Kikuchi,K., Totsuka,K. and Tomasz,A. (2000) Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb. Drug Resist.* **6**, 253-258.

Aires de,S.M., Miragaia,M., Sanches,I.S., Avila,S., Adamson,I., Casagrande,S.T., Brandileone,M.C., Palacio,R., Dell'Acqua,L., Hortal,M., Camou,T., Rossi,A., Velazquez-Meza,M.E., Echaniz-Aviles,G., Solorzano-Santos,F., Heitmann,I. and de,L.H. (2001) Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2197-2205.

Andrade.S.S. Epidemiologia molecular de Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina isolados na Argentina, Brasil e Chile no período de 1997 a 2006. Tese de Doutorado - UNIFESP. 2008, 87p.

Bantar,C., Famiglietti,A. and Goldberg,M. (2000) Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee; and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group. *Int. J. Infect. Dis.* **4**, 85-90.

Brumfitt,W. and Hamilton-Miller,J. (1989) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1188-1196.

Calfee,D.P., Durbin,L.J., Germanson,T.P., Toney,D.M., Smith,E.B. and Farr,B.M. (2003) Spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**, 422-426.

Carnicer-Pont,D., Bailey,K.A., Mason,B.W., Walker,A.M., Evans,M.R. and Salmon,R.L. (2006) Risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia: a case-control study. *Epidemiol. Infect.* **134**, 1167-1173.

Chambers,H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 781-791.

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

Chambers,H.F. and Sachdeva,M. (1990) Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **161**, 1170-1176.

Cho,D.T., Cha,H.Y., Chang,H.H., Kim,S.W., Chung,J.M., Kim,J., Lee,Y.C., Seol,S.Y. and Lee,J.C. (2006) Risk factors for specific methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Korean hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 1122-1127.

Conterno,L.O., Wey,S.B. and Castelo,A. (1998) Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**, 32-37.

Conterno.L.O. Avaliação dos aspectos epidemiológicos e evolutivos das bacteremias por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. Comparação entre dois períodos: 1991 - 1992 e 1995 - 1996. Tese de Doutorado - UNIFESP. 1999, 110p.

Cuevas,O., Cercenado,E., Bouza,E., Castellares,C., Trincado,P., Cabrera,R. and Vindel,A. (2007) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 250-256.

Davis,S.L., Rybak,M.J., Amjad,M., Kaatz,G.W. and McKinnon,P.S. (2006) Characteristics of patients with healthcare-associated infection due to SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**, 1025-1031.

de Miranda,O.P., Silva-Carvalho,M.C., Ribeiro,A., Portela,F., Cordeiro,R.P., Caetano,N., Vidal,C.F. and Figueiredo,A.M. (2007) Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1165-1172.

de Oliveira,C.L., Wey,S.B. and Castelo,A. (2002) *Staphylococcus aureus* bacteremia: comparison of two periods and a predictive model of mortality. *Braz. J. Infect. Dis.* **6**, 288-297.

de Trindade,P.A., Pacheco,R.L., Costa,S.F., Rossi,F., Barone,A.A., Mamizuka,E.M. and Levin,A.S. (2005) Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3435-3437.

Deresinski,S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 562-573.

Enright,M.C., Day,N.P., Davies,C.E., Peacock,S.J. and Spratt,B.G. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and

methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1008-1015.

Enright,M.C., Robinson,D.A., Randle,G., Feil,E.J., Grundmann,H. and Spratt,B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 7687-7692.

Fey,P.D., Said-Salim,B., Rupp,M.E., Hinrichs,S.H., Boxrud,D.J., Davis,C.C., Kreiswirth,B.N. and Schlievert,P.M. (2003) Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 196-203.

Garcia-Vazquez,E., Gomez,J., Banos,R., Canteras,M., Ruiz,J., Banos,V., Herrero,J.A. and Valdes,M. (2007) [A comparative study of patients with methicillin susceptible versus methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology and prognostic factors]. *Med. Clin. (Barc.)* **128**, 681-686.

Gomes,A.R., Sanches,I.S., Ires de,S.M., Castaneda,E. and de,L.H. (2001) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microb. Drug Resist.* **7**, 23-32.

Guilarde,A.O., Turchi,M.D., Martelli,C.M. and Primo,M.G. (2006) *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J. Hosp. Infect.* **63**, 330-336.

Haddadin,A.S., Fappiano,S.A. and Lipsett,P.A. (2002) Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad. Med. J.* **78**, 385-392.

Hiramatsu,K., Katayama,Y., Yuzawa,H. and Ito,T. (2002) Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 67-74.

Huang,S.S. and Platt,R. (2003) Risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after previous infection or colonization. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 281-285.

Ipsen,T. and Gahrn-Hansen,B. (1988) Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a department of orthopedic surgery 1970 to 1986. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 400-403.

Ito,T., Katayama,Y., Asada,K., Mori,N., Tsutsumimoto,K., Tiensasitorn,C. and 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**, 1323-1336.

Ito,T., Katayama,Y. and Hiramatsu,K. (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1449-1458.

Ito,T., Ma,X.X., Takeuchi,F., Okuma,K., Yuzawa,H. and Hiramatsu,K. (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel

cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2637-2651.

Kaplan,E.L. & Meier,P. (1958) Non parametric estimation from incomplete observation. *J. American Statistics Assoc*, **53**:457-481.

Katayama,Y., Ito,T. and Hiramatsu,K. (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1549-1555.

Katayama,Y., Ito,T. and Hiramatsu,K. (2001) Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1955-1963.

Kayser,F.H. (1975) Methicillin-resistant staphylococci 1965-75. *Lancet* **2**, 650-653.

Klevens,R.M., Edwards,J.R., Tenover,F.C., McDonald,L.C., Horan,T. and Gaynes,R. (2006) Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 389-391.

Libert,M., Elkholti,M., Massaut,J., Karmali,R., Mascart,G. and Cherifi,S. (2008) Risk factors for methicillin resistance and outcome of Staphylococcus aureus bloodstream infection in a Belgian university hospital. *J. Hosp. Infect.* **68**, 17-24.

Lyon,B.R. and Skurray,R. (1987) Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. *Microbiol. Rev.* **51**, 88-134.

Ma,X.X., Ito,T., Tiensasitorn,C., Jamklang,M., Chongtrakool,P., Boyle-Vavra,S., Daum,R.S. and Hiramatsu,K. (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1147-1152.

Manzur,A., Vidal,M., Pujol,M., Cisnal,M., Hornero,A., Masuet,C., Pena,C., Gudiol,F. and Ariza,J. (2007) Predictive factors of methicillin resistance among patients with Staphylococcus aureus bloodstream infections at hospital admission. *J. Hosp. Infect.* **66**, 135-141.

McDougal,L.K., Steward,C.D., Killgore,G.E., Chaitram,J.M., McAllister,S.K. and Tenover,F.C. (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5113-5120.

Melo,M.C., Silva-Carvalho,M.C., Ferreira,R.L., Coelho,L.R., Souza,R.R., Gobbi,C.N., Rozenbaum,R., Solari,C.A., Ferreira-Carvalho,B.T. and Figueiredo,A.M. (2004) Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *J. Hosp. Infect.* **58**, 276-285.

Milheirico,C., Oliveira,D.C. and de,L.H. (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3374-3377.

Moet,G.J., Jones,R.N., Biedenbach,D.J., Stilwell,M.G. and Fritsche,T.R. (2007) Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**, 7-13.

Monteiro.J. Avaliação comparativa de protocolos rápidos versus protocolos convencionais para tipagem molecular de amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de pulsed field gel eletrophoresis. Tese de Mestrado - UNIFESP. 2005, 113p.

Moreira,M., Freitas,M.R., Martins,S.T., Castelo,A. and Medeiros,E.A. (2007) Efficacy of a program of prevention and control for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an intensive-care unit. *Braz. J. Infect. Dis.* **11**, 57-62.

Moreira,M., Medeiros,E.A., Pignatari,A.C., Wey,S.B. and Cardo,D.M. (1998) [Effect of nosocomial bacteremia caused by oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on mortality and length of hospitalization]. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **44**, 263-268.

Moreno,C.A., Rosenthal,V.D., Olarte,N., Gomez,W.V., Sussmann,O., Agudelo,J.G., Rojas,C., Osorio,L., Linares,C., Valderrama,A., Mercado,P.G., Bernate,P.H., Vergara,G.R., Pertuz,A.M., Mojica,B.E., Navarrete,M.P., Romero,A.S. and Henriquez,D. (2006) Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**, 349-356.

Moreno,F., Crisp,C., Jorgensen,J.H. and Patterson,J.E. (1995) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin. Infect. Dis.* **21**, 1308-1312.

Murchan,S., Kaufmann,M.E., Deplano,A., de,R.R., Struelens,M., Zinn,C.E., Fusing,V., Salmenlinna,S., Vuopio-Varkila,J., El,S.N., Cuny,C., Witte,W., Tassios,P.T., Legakis,N., van,L.W., van,B.A., Vindel,A., Laconcha,I., Garaizar,J., Haeggman,S., Olsson-Liljequist,B., Ransjo,U., Coombes,G. and Cookson,B. (2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1574-1585.

Okuma,K., Iwakawa,K., Turnidge,J.D., Grubb,W.B., Bell,J.M., O'Brien,F.G., Coombs,G.W., Pearman,J.W., Tenover,F.C., Kapi,M., Tiensasitorn,C., Ito,T. and Hiramatsu,K. (2002) Dissemination of new methicillin-resistant

Staphylococcus aureus clones in the community. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4289-4294.

Oliveira,D.C. and de,L.H. (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2155-2161.

Oliveira,D.C., Milheirico,C. and de,L.H. (2006) Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3457-3459.

Oliveira,D.C., Tomasz,A. and de,L.H. (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 180-189.

Oliveira,G.A., Faria,J.B., Levy,C.E. and Mamizuka,E.M. (2001) Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **5**, 163-170.

Oztoprak,N., Cevik,M.A., Akinci,E., Korkmaz,M., Erbay,A., Eren,S.S., Balaban,N. and Bodur,H. (2006) Risk factors for ICU-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Am. J. Infect. Control* **34**, 1-5.

Rezende,N.A., Blumberg,H.M., Metzger,B.S., Larsen,N.M., Ray,S.M. and McGowan,J.E., Jr. (2002) Risk factors for methicillin-resistance among patients

with *Staphylococcus aureus* bacteremia at the time of hospital admission. *Am. J. Med. Sci.* **323**, 117-123.

Ribeiro,A., Coronado,A.Z., Silva-Carvalho,M.C., Ferreira-Carvalho,B.T., Dias,C., Rozenbaum,R., Del Peloso,P.F., da Costa Ferreira,L.C., Teixeira,L.A. and Figueiredo,A.M. (2007) Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 339-345.

Ribeiro,A., Dias,C., Silva-Carvalho,M.C., Berquo,L., Ferreira,F.A., Santos,R.N., Ferreira-Carvalho,B.T. and Figueiredo,A.M. (2005) First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1985-1988.

Roberts,R.B., Tennenberg,A.M., Eisner,W., Hargrave,J., Drusin,L.M., Yurt,R. and Kreiswirth,B.N. (1998) Outbreak in a New York City teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. *Microb. Drug Resist.* **4**, 175-183.

Sa-Leao,R., Santos,S., I, Dias,D., Peres,I., Barros,R.M. and de,L.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**, 1913-1920.

Sader,H.S., Jones,R.N., ndrade-Baiocchi,S. and Biedenbach,D.J. (2002a) Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 273-280.

Sader,H.S., Jones,R.N. and Silva,J.B. (2002b) Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 281-288.

Sader,H.S., Pignatari,A.C., Hollis,R.J. and Jones,R.N. (1994) Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **15**, 320-323.

Sader,H.S., Pignatari,A.C., Hollis,R.J., Leme,I. and Jones,R.N. (1993) Oxacillin- and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **14**, 260-264.

Sanches,I.S., Aires de,S.M., Sobral,L., Calheiros,I., Felicio,L., Pedra,I. and de,L.H. (1995) Multidrug-resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal. *Microb. Drug Resist.* **1**, 299-306.

Seybold,U., Kourbatova,E.V., Johnson,J.G., Halvosa,S.J., Wang,Y.F., King,M.D., Ray,S.M. and Blumberg,H.M. (2006) Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 647-656.

Sharma,V.K., Hackbarth,C.J., Dickinson,T.M. and Archer,G.L. (1998) Interaction of native and mutant *MecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* **180**, 2160-2166.

Shorr,A.F. (2007) Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin. Infect. Dis.* **45 Suppl 3**, S171-S176.

Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical taxonomy. pp. 573.

Sola,C., Gribaudo,G., Vindel,A., Patrino,L. and Bocco,J.L. (2002) Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1427-1435.

Struelens,M.J., Deplano,A., Godard,C., Maes,N. and Serruys,E. (1992) Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2599-2605.

Tacconelli,E. (2006) New strategies to identify patients harbouring antibiotic-resistant bacteria at hospital admission. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 102-109.

Tacconelli,E., De,A.G., Cataldo,M.A., Pozzi,E. and Cauda,R. (2008) Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 26-38.

Teixeira,L.A., Resende,C.A., Ormonde,L.R., Rosenbaum,R., Figueiredo,A.M., de,L.H. and Tomasz,A. (1995) Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2400-2404.

Tenover,F.C., Arbeit,R.D., Goering,R.V., Mickelsen,P.A., Murray,B.E., Persing,D.H. and 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.

Trindade,P.A.Characterização molecular da resistência a oxacilina em isolados de *Staphylococcus aureus* hospitalares e comunitários. Tese de Doutorado - FM USP. 2005, 90p.

van Soolingen D., Hermans,P.W., de Haas,P.E., Soll,D.R. and van Embden,J.D. (1991) Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2578-2586.

Vidal.P.M. Fatores associados à infecção de corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* portador de SCCmec tipo IV. Tese de Mestrado - FM USP. 2007, 80p.

Wang,F.D., Chen,Y.Y., Chen,T.L. and Liu,C.Y. (2008) Risk factors and mortality in patients with nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Am. J. Infect. Control* **36**, 118-122.

Zhang,K., McClure,J.A., Elsayed,S., Louie,T. and 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**, 5026-5033.

---

## 8. RESUMO

**Objetivos:** (i) avaliar a diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) no complexo UNIFESP/HSP isolados de hemocultura; (ii) avaliar possíveis fatores de risco associados à bacteremia e mortalidade causada pelo Clone Epidêmico Brasileiro (CEB) e por outros clones de MRSA. **Material e Métodos:** Estudo retrospectivo de isolados de MRSA do período de 2002 a 2005. Coletou-se dados epidemiológicos nos prontuários dos pacientes e os tipos de SCCmec foram caracterizados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Caso fosse pertinente, foi realizada a detecção de produção de leucocidina Pantone-Valentine (PVL). A presença de possíveis clones foi investigada por PFGE (pulsed field gel electrophoresis). **Resultados:** Foram avaliados 148 episódios de bacteremia por MRSA. A maioria das infecções foi considerada relacionada à assistência à saúde (92,6%); 77% dos pacientes receberam antibioticoterapia prévia e 74,3% fizeram uso de cateter venoso central. O SCCmec tipo III foi encontrado em 87% das amostras e 19 amostras carregavam SCCmec I, II ou IV. Dentre as 10 amostras portadoras de SCCmec IV apenas uma foi produtora de PVL, e quatro foram detectadas em pacientes pediátricos. O dendograma obtido pelo perfil de bandas de PFGE identificou quatro principais clusters dentre as amostras. CEB (SCCmec III) foi relacionado a 128 amostras, e o clone pediátrico (SCCmec IV). Além disso, duas amostras foram relacionadas ao USA300 e USA400. Antibioticoterapia prévia foi considerado fator de risco para aquisição de bacteremia por MRSA SCCmec III. Não houve diferença entre as taxas de sobrevivência de acordo com o tipo de SCCmec. **Conclusões:** O SCCmec tipo III foi o tipo predominante de MRSA causador de bacteremias no HSP. CEB continua a ser o clone predominante apesar da emergência de novas linhagens. Antibioticoterapia prévia foi o único fator de risco relacionado à aquisição de MRSA portador de SCCmec tipo III em nosso meio.

## 9. ABSTRACT

**Objectives:** (i) to evaluate the genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from bloodstream infections (BSIs) from UNIFESP/HSP complex; (ii) to evaluate risk factors and mortality associated with bacteremia caused by Brazilian Epidemic Clone (BEC) and other MRSA lineages.

**Methods:** Retrospective study selecting with MRSA causing BSIs during 2002 to 2005. Patient demographic information was obtained, and SCC*mec* types were performed by polymerase chain reaction (PCR) multiplex. Detection of Panton Valentine Leukocidin (PVL) was performed when necessary. Genetic relatedness among clinical isolates was assessed by PFGE (pulsed field gel eletrophoresis). **Results:** A total of 148 MRSA bacteremia episodes were investigated. Most infections were considered nosocomial (92.6%); 77.0% of patients have previously used antimicrobial therapy and 74.3% had a central venous line. SCC*mec* type III was found in 87.0% (n=129) of isolates and 19 carried either SCC*mec* I, II, IV. Only one out of 10 samples harboring SCC*mec* type IV carried PVL, and 4 samples were isolated from pediatric patients. The dendogram based PFGE analysis identified four major MRSA clusters. Most SCC*mec* III isolates were related to the BEC, (n=128), and seven SCC*mec* IV isolates were associated to the pediatric clone. Two isolates SCC*mec* IV were related to USA300 and USA400 clones. Previous antimicrobial therapy was considered a risk factor for SCC*mec* III MRSA bacteremia. No difference between survival rates was observed according to SCC*mec* types. **Conclusions:** SCC*mec* III was the predominant lineage associated to MRSA bacteremia in HSP. Although BEC continues to be the predominant clone in our nosocomial environment, new lineages of SCC*mec* were observed in the study period. Previous antimicrobial therapy was the only risk factor associated with acquisition of type III MRSA bacteremia.

## 10. ANEXO

<b>Nº banco:</b>	<b>Data banco:</b>	<b>Data pedido:</b>
<b>Nome:</b>		
<b>RG HOSP:</b>	<b>RG LAB:</b>	
<b>Sexo:</b>	<b>Idade:</b> <input type="checkbox"/> meses <input type="checkbox"/> anos	
<b>Data de internação hospitalar:</b> /    / 200__	<b>Local de internação:</b>	
<b>Internação prévia?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Obs.:		
<b>Esteve em UTI?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Obs.:		
<b>Sepse?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Obs.:		
<b>Óbito?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Obs.:		
<b>Relacionado à infecção?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Obs.:		
<b>Tempo de internação até a bacteremia (horas):</b>		
<b>Infecção hospitalar?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Obs.:		
<b>Fonte da infecção:</b>		
<input type="checkbox"/> Primária ou associada a catéter	<input type="checkbox"/> Gastrointestinal	<input type="checkbox"/> Pulmonar
<input type="checkbox"/> Pele	<input type="checkbox"/> Urina	<input type="checkbox"/> Ferida cirúrgica
<input type="checkbox"/> Ouvido, nariz, garganta, sinus	<input type="checkbox"/> Outras (especificar)	
<b>Doença de base:</b> <input type="checkbox"/> Presente <input type="checkbox"/> Ausente		
<b>Fatores de risco:</b>		
<input type="checkbox"/> Catéter central	<input type="checkbox"/> Catéter periférico	<input type="checkbox"/> Transplante

<input type="checkbox"/> Diálise	<input type="checkbox"/> Ventilação mecânica	<input type="checkbox"/> Catéter urinário
<input type="checkbox"/> Outros (especificar)		
<b>Antibioticoterapia prévia</b> (últimos 15 dias anterior à hemocultura) Quais?Tempo de uso?		
<b>Antibioticoterapia pós e tempo de uso:</b>		



# 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](#)