



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E**  
**PARASITOLOGIA APLICADAS**  
**CURSO DE DOUTORADO**

OCORRÊNCIA DE SCCmec TIPO IV DE *Staphylococcus aureus* EM INFECÇÕES  
COMUNITÁRIAS E HOSPITALARES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
MINAS GERAIS

KARINNE SPIRANDELLI CARVALHO NAVES

**UBERLÂNDIA - MG**

**ABRIL/2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- N323o Naves, Karinne Spirandelli Carvalho, 1975-  
Ocorrência de SCCmec tipo IV de *Staphylococcus aureus*  
em infecções comunitárias e hospitalares em um hospital univer-  
sitário de Minas Gerais [manuscrito] / Karinne Spirandelli Carva-  
lho Naves. - 2011.  
95 f. : il.
- Orientador: Paulo P. Gontijo Filho.  
Co-orientadora: Elsa Massae Mamizuka.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplica-  
das.  
Inclui bibliografia.  
1. Infecção hospitalar - Teses. 2. *Staphylococcus aureus* - Teses.  
I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Mamizuka, Elsa Massae. III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 616.98:615.478



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS  
CURSO DE DOUTORADO

OCORRÊNCIA DE SCCmec TIPO IV DE *Staphylococcus aureus* EM INFECÇÕES  
COMUNITÁRIAS E HOSPITALARES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
MINAS GERAIS

Tese apresentada ao colegiado do Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal de Uberlândia, como  
requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

*Karinne Spirandelli Carvalho Naves*

*Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo P. Gontijo Filho (Orientador)*

*Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elsa Massae Mamizuka (Co-orientadora)*

KARINNE SPIRANDELLI CARVALHO NAVES

**UBERLÂNDIA - MG**

**Abril – 2011**

*Aos meus amores, Winkler e Ana Clara,  
que alegram minha vida e fazem  
as lutas mais suaves.*

*"A vida é o campo experimental onde têm lugar as lutas e onde cada um  
vence ou é derrotado; mas é, também, o cenário onde o espírito se  
tempera verdadeiramente e onde, pouco a pouco, com vontade e  
entusiasmo grandes, vai se lavrando um novo e elevado destino".*

*Carlos Bernardo González Pecotche (Raumsol)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de mais uma vitória;

Aos meus pais, avós e irmãos pela confiança, paciência, carinho, apoio e dedicação;

À minha família, Winkler, Ana Clara, Yan e Yago pelo amor, apoio, compreensão e carinho;

À minha sogra Ana Rosa pela colaboração e cuidados, comigo e com minha família;

Ao meu Orientador Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho que generosamente me deu esta oportunidade e, com paciência e confiança me ajudou a concluir este trabalho;

À minha Co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elsa Massae Mamizuka pela enorme colaboração e também pelo carinho com que me recebeu;

Às estudantes Lara Almeida e Tayná Guimarães do laboratório de análises clínicas e toxicológicas da USP pelas contribuições prestadas;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloísa Amália Vieira Ferro, coordenadora da pós-graduação, pelas colaborações e orientações;

Ao amigo Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo pela amizade e ensinamentos;

À amiga Maria Christina Mouta Rink que continua sendo um grande exemplo;

Às professoras Rosineide e Denise pelo apoio e pela colaboração;

Aos técnicos do laboratório, Claudete e Ricardo, pela colaboração sempre certa, pela amizade e paciência;

Às amigas Renata e Lizandra pelos momentos felizes e incentivos;

À amiga Natália pela rica colaboração prestada a este trabalho;

Aos colegas pós-graduação e laboratório Juliana, Cristiane, Lilian, Nayara, Marcília, Ana Paula, Dayane, Raquel, Monique, Deivid, Michel e Elias pelo companheirismo;

À Lucileide, Lucélia e Jorge pela colaboração e amizade;

Aos amigos José Renato, André, Rodrigo, Marcelo, João Henrique, Tony, Juliana Bisinotto, Juliana Jacob, Mirna, Fúlvia, Marília, Zelma, Juliana Faquim, Geiza, Denielle, Celi, Valdirene, Frederico, Natália e Roberta;

Às pessoas que estiveram ao meu lado durante esta caminhada e que, mesmo de forma indireta, colaboraram para que este trabalho fosse concluído.

## ÍNDICE

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>Lista de Abreviaturas</b>                       | <b>8</b>  |
| <b>Lista de Tabelas</b>                            | <b>10</b> |
| <b>Lista de Figuras</b>                            | <b>11</b> |
| <b>Lista de Anexos</b>                             | <b>12</b> |
| <b>Resumo</b>                                      | <b>13</b> |
| <b>Abstract</b>                                    | <b>15</b> |
| <b>1 - INTRODUÇÃO</b>                              | <b>17</b> |
| <b>2 - OBJETIVOS</b>                               | <b>25</b> |
| <b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>                      | <b>26</b> |
| 3.1 Hospital                                       | 26        |
| 3.2 Modelo do estudo                               | 26        |
| 3.3 Vigilância                                     | 26        |
| 3.4 Definições                                     | 27        |
| 3.5 Técnicas microbiológicas                       | 28        |
| 3.5.1 Coleta                                       | 28        |
| 3.5.2 Cultivo Primário                             | 29        |
| 3.5.3 Sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos | 29        |
| 3.6 Testes moleculares                             | 31        |
| 3.7 Análise estatística                            | 36        |
| 3.8 Aprovação pelo Comitê de Ética                 | 36        |
| <b>4 - RESULTADOS</b>                              | <b>37</b> |
| <b>5 - DISCUSSÃO</b>                               | <b>50</b> |
| <b>6 - CONCLUSÕES</b>                              | <b>62</b> |
| <b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>              | <b>64</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

**MR-MRSA** – MRSA multirresistente

**Não MR-MRSA** – MRSA não-multirresistente

**CA-MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina de aquisição comunitária

**HA-MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina de aquisição hospitalar

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

**IH** – Infecções Hospitalares

**NNISS** – National Nosocomial Infection Surveillance System

**NCCLS** – National Committee for Clinical Laboratory Standards

**IrAS** – Infecção relacionada à assistência à de saúde

**HC-UFU** - Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

**ISC** - Infecção de Sítio Cirúrgico

**ICS** - Infecção de Corrente Sangüínea

**PAV** – Pneumonia associada à prótese ventilatória

**DPOC** – Doença pulmonar obstrutiva crônica

**UTI** - Unidade de Terapia Intensiva

**PBPs** - Proteínas Ligadoras de Penicilina

**UFC/ ml** - Unidade Formadora de Colônia por mL

**PCR** – Polymerase Chain Reaction

**PFGE** – Pulsed Field Gel Electrophoresis

**MLST** – Multilocus Sequence Typing

**SCC** – Staphylococcal Cassette Chromosome

**ST** – Sequence Type

**CC** – Complexo Clonal

**PVL** – Leucocidina Panton-Valentine

**CDC** – Center for Disease Control and Prevention

**NNIS** – National Nosocomial Infection Surveillance

**EMRSA** – epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

$\leq$  – Menor ou igual

$\geq$  – maior ou igual

**µg/ml** – micrograma por mililitro

~ – aproximadamente

**° C** – graus celsius

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                  | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabela 1.</b> Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> susceptíveis ou resistentes à meticilina em pacientes internados no HC-UFU, de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                  | 37     |
| <b>Tabela 2.</b> Sítios de infecção / infecções por amostras de MRSA em pacientes internados no HC da UFU, de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                                               | 37     |
| <b>Tabela 3.</b> Classificação das infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> em pacientes internados no HC-UFU, quanto à origem e evolução clínica dos pacientes, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.            | 38     |
| <b>Tabela 4.</b> Fatores de risco relacionados aos pacientes com infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                         | 39     |
| <b>Tabela 5.</b> Fatores de risco extrínsecos para infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> diagnosticados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                        | 40     |
| <b>Tabela 6.</b> Análise multivariada dos fatores de risco para infecção por microrganismos multirresistentes diagnosticados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                       | 41     |
| <b>Tabela 7.</b> Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de amostras de MR-MRSA e não-MR isolados de pacientes internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                     | 42     |
| <b>Tabela 8.</b> Características das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> SCCmec tipo IV isolados no HC-UFU, de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                                         | 43     |
| <b>Tabela 9.</b> Fatores de risco relacionados aos pacientes com infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> SCCmec tipo IV isolados no laboratório de microbiologia do HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008. | 44     |
| <b>Tabela 10.</b> Fatores de risco extrínsecos para infecção por amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> SCCmec tipo IV isoladas no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                             | 44     |
| <b>Tabela 11.</b> Fatores de risco intrínsecos relacionados aos pacientes com infecção por MRSA e MRSA SCCmec IV no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                   | 45     |
| <b>Tabela 12.</b> Fatores de risco extrínsecos para infecção por MRSA e MRSA SCCmec IV diagnosticados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                              | 47     |
| <b>Tabela 13.</b> Análise multivariada dos fatores de risco para infecção por MRSA SCCmecIV e MRSA diagnosticados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.                                                  | 48     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Página</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1. eBURST analysis of <i>S. aureus</i> . Data from the MLST website ( <a href="http://www.mlst.net/">http://www.mlst.net/</a> ) and eBURST software ( <a href="http://eburst.mlst.net/">http://eburst.mlst.net/</a> ), 23 December 2009. Major CC and ST types are indicated. (Yamamoto et al., 2010) | <b>20</b>     |
| Figura 2: Global distribution of predominant successful clones of community-associated meticillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> . PVL+=Panton-Valentine leukocidin positive. PVL-=PVL negative. SWP=southwest Pacific. WA=western Australia. (Otter & French,2010)                                  | <b>23</b>     |
| Figura 3. Genótipos do PFGE das oito amostras não MR-MRSA, SCC <i>mecIV</i> , isoladas de pacientes do hospital de clínicas da UFU.                                                                                                                                                                          | <b>49</b>     |

## LISTA DE ANEXOS

|                                                                                | <b>Página</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de<br>Uberlândia | <b>81</b>     |
| Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido                           | <b>82</b>     |
| Anexo III. Ficha sócio-demográfica                                             | <b>83</b>     |
| Anexo IV. Artigo de Qualificação                                               | <b>84</b>     |

## Resumo

Desde o primeiro relato de MRSA (“Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”), este microrganismo se disseminou nos hospitais em diferentes regiões do mundo e, atualmente, é considerado como o principal agente de infecções hospitalares causando infecções benignas, como as de pele e tecido mole, e graves, como pneumonia e sepse. A partir da década de 80, amostras de MRSA / CA-MRSA (“Community-acquired-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”) foram isoladas a partir infecções comunitárias em indivíduos sem a presença de fatores de risco. Na última década houve um aumento na participação destas amostras em infecções de natureza hospitalar, sobretudo nos EUA. Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de amostras de CA-MRSA e HA-MRSA (“Hospital-acquired-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”) associadas a infecções comunitárias e hospitalares considerando aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no período de Setembro de 2006 a Setembro de 2008. As culturas de *S. aureus* foram obtidas no laboratório de microbiologia clínica do HC-UFU e, aquelas classificadas como não-multirresistentes foram submetidas aos testes genotípicos (“Polimerase Chain Reaction”, “Pulsed Field Gel Electrophoresis” e “Multilocus Sequence Typing”). No total, foram selecionadas 206 amostras de MRSA, com apenas 45 (21,8%) não-multirresistentes. Após a realização dos testes genotípicos oito amostras foram identificadas como SCC*mec* (“Staphylococcal Cassete Chromosome *mec*”) IV pertencentes a um único clone pela técnica de PFGE, com seis pulsotipos, sendo sete identificadas como do clone ST (“Sequence Typing”) 5 pelo MLST. Os dados obtidos revelaram uma prevalência de CA-MRSA inferior (não-multirresistente – 21,8%, SCC*mec*IV –

3,8%) à relatada nos Estados Unidos, com predomínio de um clone (CC5/ST5, PVL-) de HA-MRSA isolado de pacientes com diversos tipos de infecções hospitalares e fatores de risco. Em apenas uma criança foi recuperada uma amostra do tipo SCC*mecIV* de origem comunitária correspondente a um episódio de otite, também caracterizado como do clone ST5.

As amostras SCC*mecIV* mostraram resistogramas distintos e 100% de susceptibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim. Foram fatores de risco independentes relacionados às infecções pelo microrganismo multirresistente evolução para óbito e relacionada a infecção pela amostra não-multirresistente infecção de pele e tecido mole e internação em unidades pediátricas. A mortalidade hospitalar no prazo de 30 dias foi de 47,8% de entre MRSA multirresistentes e 26,6% entre amostras não-multirresistentes. Não houve óbitos entre os pacientes infectados por MRSA SCC*mecIV*. A vigilância epidemiológica das diversas linhagens / clones de MRSA, hospitalares ou comunitárias, por sua importância médica e hospitalar, deve ser motivo de investigação preocupação pelos serviços de saúde pública.

Palavras-chave: MRSA, SCC*mecIV*, CA-MRSA, MLST, Infecções Hospitalares.

## Summary

Since the first MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) report, this pathogen has spread in hospitals in different regions of the world and is currently regarded as the major nosocomial infections agent, causing benign infections, such as skin and soft tissue and serious, like pneumonia and sepsis. In early 80's MRSA samples were isolated from community infections in individuals without the presence of risk factors (CA-MRSA - Community-acquired-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). During the last decade there was a CA-MRSA participation in hospital infections increase, especially in the U.S.. This study aimed to investigate CA-MRSA and HA-MRSA (Hospital-acquired-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) samples in hospital and community infections, considering classical and molecular epidemiological aspects at the Hospital de Clinicas, Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), from September 2006 to September 2008. *S. aureus* cultures were obtained from HC-UFU laboratory, and those classified as non-multiresistant were tested for genotypic (Polimerase Chain Reaction, Pulsed Field Gel Electrophoresis e Multilocus Sequence Typing). In total, 206 MRSA samples were selected, with only 45 (21.8%) non-multiresistant. After genotyping tests eight samples were identified as SCCmec (Staphylococcal Cassete Chromosome *mec*) IV, belonging to a single clone by PFGE technique, with six pulsotypes. Seven of them were ST (Sequence Typing) 5 (CC5) by MLST. Data indicate a low CA-MRSA prevalence (non MR - 21.8% SCCmecIV - 3.8%) then reported in the United States, isolated from patients with several kind of hospital infections and risk factors. Only one SCCmecIV sample, recovered from a child had community origin, corresponding to an otitis, also characterized as ST5 clone. SCCmecIV samples showed distinct resistance profile and susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole in all of them. Evolution to death related to multidrug-

resistant organism infections and skin / soft tissue infection or hospitalization in pediatric units to non-multiresistant infection, were independent risk factors. Hospital mortality was 47.8% among multidrug-resistant MRSA and 26.6% among non-multidrug-resistant samples. There were no deaths among patients infected with MRSA SCC*mecIV*. Epidemiological studies of different MRSA strains, in hospital or community, for the medical and hospital relevance, should be cause for public health services concern and additional investigations.

Keywords: MRSA, SCC*mecIV*, CA-MRSA, MLST, Hospital Infections.

## 1- Introdução

As infecções associadas à assistência à saúde (IrAS) representam um sério problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos causando aumento significativo na morbidade, mortalidade e custos hospitalares (BOYCE, 2001). Nos Estados Unidos da América (EUA), 5,0 a 10,0% dos pacientes adquirem infecção hospitalar, resultando em aproximadamente 80.000 mortes e um custo financeiro adicional de US\$ 4 bilhões por ano (YALCIN, 2003).

*Staphylococcus aureus* está associado com vários tipos de infecções destacando-se as de pele e tecidos moles como impetigo bolhoso, abscesso e furunculose. Adicionalmente, causa infecções sistêmicas e potencialmente fatais como bacteremias, endocardites e pneumonias, além de doenças associadas às toxinas estafilocócicas como intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (SAFDAR & BRADLEY, 2008, DURUPT *et al.*, 2007).

*Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes associados às IrAS (EYKYN, GRANSDEN & PHILLIPS, 1990) predominando as de sítio cirúrgico (ISC), e está relacionado entre os três principais agentes de pneumonias (18,8%) e infecções de corrente sanguínea (12,6%), sendo estas últimas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (CDC, 2006). Dados do “Sentry” no Brasil revelam que ele é o patógeno mais frequentemente associado a infecções de corrente sanguínea, pele e tecido mole e pneumonias em pacientes hospitalizados, especialmente em unidades de terapia intensiva (GALES *et al.*, 2009).

Desde o primeiro relato de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (“methicillin / oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*” - MRSA) no Reino Unido em 1961, este patógeno se disseminou nos hospitais nas diferentes regiões do mundo (ENRIGHT *et al.*, 2002). Os dados de vigilância evidenciam que o percentual de

infecções estafilocócicas devido ao fenótipo resistente supera o atribuído à amostra susceptível à meticilina / oxacilina (SHUKLA *et al.*, 2004). MRSA é considerado como o principal agente de IrAS (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Atualmente, na casuística NNIS (“National Nosocomial Infection Surveillance”), ele responde por 62,0% das infecções de sítio cirúrgico (ISC), 60,0% das pneumonias (WUNDERINK *et al.*, 2003) e 20,0 % das infecções de corrente sanguínea (TENOVER, BIDDLE & LANCASTER, 2001), causadas por *S. aureus*. No Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia as frequências de estafilococcias e bacteremias hospitalares por este fenótipo foram de 44,0% (SADOYAMA & GONTIJO FILHO, 2000) e 39,2%, respectivamente (RIBAS, MELO & GONTIJO FILHO, 2003).

O mecanismo de resistência à meticilina nas amostras de MRSA / ORSA ocorre pela presença de uma proteína ligadora de penicilina (“Penicillin Binding Protein” - PBP) de baixa afinidade para esse antibiótico, PBP2’ ou PBP2a na membrana plasmática, codificada pelo gene cromossômico *mecA* (CHAMBERS, 2001; ROBINSON & ENRIGHT, 2004; OTTER & FRENCH, 2010). Este gene, que é carregado por um elemento genético móvel (“staphylococcal cassette chromosome *mec*” - SCC*mec*) (ROBINSON & ENRIGHT, 2003), e confere resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (HANSSEN & SOLLID, 2005), e está usualmente associado a genes de resistência a outras classes de antimicrobianos incluindo macrolídeos, fluorquinolonas, clindamicina e rifampicina, entre outros, resultando em multirresistência das amostras (BOYCE *et al.*, 1994; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

Bactérias aeróbias Gram-positivas multirresistentes foram responsáveis por 39,0% das IrAS analisadas pelo sistema NNIS no período de janeiro de 1990 a março de 1996, sendo *Staphylococcus aureus* o microrganismo mais comum (FRENCH, 2004).

Estudos experimentais demonstram que as amostras sensíveis (“methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* - MSSA) não diferem das resistentes (MRSA) quanto à destruição por fagócitos, produção de hemolisinas, enzimas e toxinas e letalidade em modelos animais (YOON et al., 2005). A maior parte dos estudos caso-controle não apresentam diferenças quanto à morbi-mortalidade quando pacientes com infecções por MRSA são comparados àqueles com infecções por MSSA. Entretanto, há relatos que sugerem maior virulência de MRSA (HARTSTEIN, SEBASTIAN & STRAUSBAUGH, 2004). Um estudo recente sustenta que infecções de corrente sanguínea causadas por MRSA estão associadas a uma taxa de mortalidade maior que aquelas por MSSA (HURLEY, 2002).

MRSA é primariamente um patógeno hospitalar e está usualmente presente em centros terciários e de grande porte (YAMAMOTO *et al.*, 2010). Entretanto, também pode colonizar pacientes idosos internados em “Nursing Homes”, de forma que, os pacientes cuidados nestas instituições representam reservatórios potenciais deste microrganismo (KAUFFMAN, BRADLEY & TERPENNING, 1990). Algumas amostras de MRSA apresentam maior habilidade de disseminação hospitalar e eventualmente comunitária. São denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina epidêmicos (“epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” – EMRSA) e relatadas principalmente no Reino Unido (COOKSON & PHILLIPS, 1988).

No ambiente hospitalar os principais reservatórios de MRSA são pacientes infectados e colonizados na mucosa de narinas anteriores, além de faringe, reto, feridas e lesões crônicas de pele; e a principal via de transmissão nosocomial são as mãos de profissionais de saúde (CROSSLEY & THURN, 1992). Entre os fatores de risco para colonização e / ou infecção destacam-se: tempo de hospitalização, comorbidades, cirurgias, cuidados em UTI, procedimentos invasivos e exposição



SILVA COIMBRA *et al.*, 2003), caracterizados pela multirresistência a diferentes classes de antibióticos e acometem pacientes com fatores de risco descritos anteriormente. Os clones de MRSA mais freqüentes associados aos serviços de assistência à saúde estão, atualmente, agrupados em cinco complexos clonais: CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45, relacionados na figura 1.

A partir da década de 80 amostras de MRSA foram isoladas de aborígenes australianos e crianças da comunidade, sem a presença de fatores de risco clássicos para aquisição de infecções por MRSA (CHAMBERS & DE LEO, 2009; YAMAMOTO, 2010) e, atualmente, de outros grupos populacionais sem histórico de internação no último ano, bem como, de forma crescente, em pacientes hospitalizados (TENOVER *et al.*, 2006; REDZINIAK *et al.*, 2009), com evidência de aquisição do microrganismo na comunidade (“community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” - CA-MRSA). Estas amostras são classificadas na sua maioria como SCCmec tipos IV e V (YAMAMOTO *et al.*, 2010; SKOV & JENSEN, 2009).

Recentemente, foram propostos alguns fatores de risco para infecções por CA-MRSA: história de colonização / infecção por CA-MRSA, contato íntimo com pessoa colonizada / infectada por CA-MRSA, praticantes de esportes que envolvem contato físico, usuários de drogas injetáveis, presidiários, militares e homossexuais masculinos (REDZINIAK *et al.*, 2009). Estes grupos têm em comum, de acordo com definições do CDC (“US Centers for Disease Control and Prevention’s”), os 6 “Cs” para transmissão: contato cutâneo com superfícies contaminadas (“Contact”), limpeza / higiene precária (“Cleanliness”), pele comprometida (“Compromised skin integrity”), itens compartilhados (“Contaminated objects”) e aglomeração (“Crowded living conditions”), além do uso freqüente de antimicrobianos (“Capsules”) (MILLER & DIEP, 2008). De acordo com Yamamoto *et al.* (2010) CA-MRSA deve apresentar uma habilidade

diferenciada para colonizar e infectar indivíduos saudáveis na comunidade. São ainda, amostras não relacionadas aos clones internacionais de HA-MRSA uma vez que exibem sensibilidade a algumas drogas antimicrobianas (VANDENESCH *et al.*, 2003).

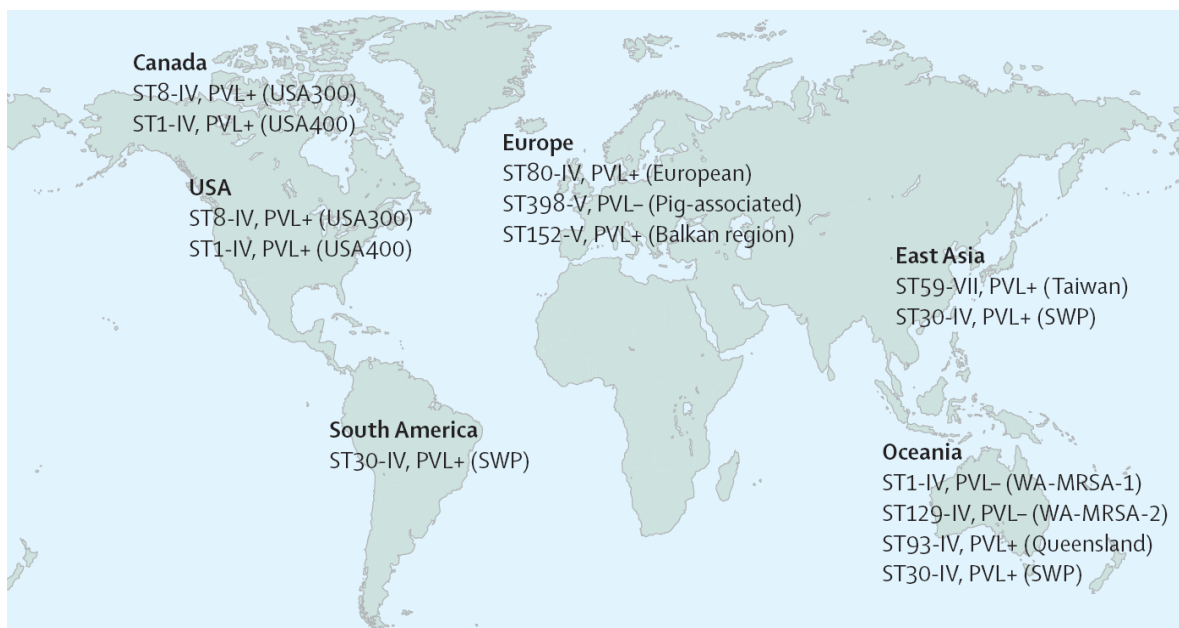
O fenótipo CA-MRSA abriga o gene *SCCmec* tipo IV, que confere resistência apenas a  $\beta$ -lactâmicos e heterorresistência à meticilina e, freqüentemente, os genes *lukS-lukF* que codificam a leucocidina (“Panton-Valentine leucocidin” - PVL). As diferenças entre estas linhagens de MRSA e a hospitalar incluem características como crescimento mais rápido “*in vitro*” e características adicionais de virulência como a produção de PVL, elementos móveis do catabólito da arginina (OKUMA *et al.*, 2002) e modulinas solúveis em fenol ainda não demonstradas no HA-MRSA (DUFOUR *et al.*, 2002). CA-MRSA usualmente apresenta valores baixos de MIC para oxacilina ( $\leq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ) e imipenem ( $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ ) que podem ser utilizados como marcadores (TAKANO & HIGUCHI, 2009) e sensibilidade a vários antimicrobianos como: sulfametoxazol-trimetoprim, fluorquinolonas, clindamicina e gentamicina (POPOVICH *et al.*, 2007) que podem ser combinados para fornecer informações importantes no estudo epidemiológico de CA-MRSA (POPOVICH, WEINSTEIN & HOTA, 2008).

As formas clínicas relacionadas às infecções por CA-MRSA envolvem doenças de pele e tecido mole (GILLET *et al.*, 2002; VAN DER FLIER *et al.*, 2003) incluindo infecções piogênicas de pele (NAIMI *et al.*, 2003). CA-MRSA pode também causar infecções de sítio cirúrgico, infecções de trato urinário, infecções oculares, meningite e sinusites (YAMAMOTO *et al.*, 2010) bem como infecções graves como pneumonia necrosante e sepse (TRINDADE *et al.*, 2005).

Na última década houve um aumento na participação deste microrganismo em infecções de natureza hospitalar nos EUA (POPOVICH, WEINSTEIN & HOTA, 2008), em países da Europa (OTTER & FRENCH, 2010) e no Brasil (RIBEIRO *et*

*al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2007; SCHUENCK *et al.*, 2009). A identificação de CA-MRSA, na comunidade ou no ambiente hospitalar, deve ser realizada a partir de dados epidemiológicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e caracterização genotípica, utilizando as técnicas: tipagem do SCCmec, identificação dos genes codificadores de PVL e proteína A (“*spa* type”) e além da determinação da clonalidade por PFGE e MLST (DIEP *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2010).

As características moleculares e a epidemiologia dos principais clones de CA-MRSA têm sido amplamente estudadas e incluem os STs: ST8-IV, PVL+ (USA300) e ST1-IV, PVL+ (USA400) nos Estados Unidos e Canadá (YAMAMOTO *et al.*, 2010); ST80-IV, PVL+ na Europa; ST59-VII, PVL+ e ST30-IV, PVL+ (OSPC) na Ásia e ST1-IV, PVL- (WA-1), ST129-IV, PVL- (WA-2), ST93-IV, PVL+ (Queensland) e ST30-IV, PVL+ (OSPC) na Oceania (Austrália), mostrados na figura



2 (OTTER & FRENCH, 2010).

Figura 2: Global distribution of predominant successful clones of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PVL+=Panton-Valentine

leukocidin positive. PVL–=PVL negative. SWP=southwest Pacific. WA=western Australia. (Otter & French,2010)

Os primeiros relatos de infecções causadas por CA-MRSA no Brasil foram se referiram a três pacientes, sendo dois com infecção de pele e tecido mole e um com artrite séptica e, ainda, duas amostras de origem indeterminada obtidas no ambulatório de dois hospitais em Porto Alegre (RIBEIRO *et al.*, 2005). Trindade e colaboradores (2005) relataram 13,0% de amostras SCCmecIV provenientes de infecções de corrente sanguínea de origem hospitalar. Posteriormente Ribeiro *et al.* (2007) detectaram 13 casos de MRSA SCCmecIV, classificados como ST30 e ST1, no Rio de Janeiro e em Porto Alegre classificados, respectivamente, como infecções comunitárias e hospitalares, demonstrando a participação do fenótipo comunitário como agente de IrAS também no Brasil, a exemplo do observado em outros países.

## 2- Objetivos

### 2.1- Objetivo Geral

- Investigar a ocorrência de CA-MRSA e / ou HA-MRSA associados a infecções comunitárias e hospitalares no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no período de Setembro de 2006 a Setembro de 2008.

### 2.2- Objetivos Específicos

- Analisar a participação de CA-MRSA e / ou HA-MRSA nas infecções de pele e tecidos moles incluindo aquelas de sítio cirúrgico (infecções incisionais), pneumonias, pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) e sangue;
- Descrever a natureza hospitalar ou comunitária das infecções associadas aos dois fenótipos.
- Identificar fatores de risco que possam estar associados às infecções pelos dois fenótipos.
- Avaliar antimicrobianos como marcadores fenotípicos para identificação presuntiva de amostras de CA-MRSA.
- Definir perfis genotípicos das amostras de CA-MRSA através da técnica de tipagem por Eletroforese em Campo Pulsátil (PFGE);
- Definir perfis genotípicos das amostras de CA-MRSA através da técnica de tipagem por “Multilocus Sequence Typing” (MLST);
- Pesquisar marcadores genotípicos de fatores de patogenicidade (PVL e  $\alpha$ -toxina).

### 3- Material e métodos

#### 3.1- Hospital

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), que possui 570 leitos e oferece atendimento de nível terciário, após aprovação no comitê de ética (Parecer 218/06) (Anexo I).

#### 3.2- Modelo de Estudo

Foi realizada uma investigação da ocorrência de CA-MRSA e HA-MRSA em amostras de infecções de pele, tecidos moles incluindo pus, de pacientes com infecção de sítio cirúrgico e corrente sanguínea; de pacientes internados ou atendidos no ambulatório do hospital que apresentaram diagnóstico de infecção por *S. aureus*. Estes fenótipos foram também pesquisados a partir do aspirado endotraqueal de pacientes com pneumonia associada a prótese ventilatória (PAV) internados na UTI de adultos com resultado positivo de infecção por *Staphylococcus aureus*. As amostras foram coletadas no período de Setembro de 2006 a Setembro de 2008.

Os responsáveis pelos pacientes internados na UTI assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II) autorizando a coleta do aspirado endotraqueal.

#### 3.3- Vigilância

As culturas de *S. aureus* (pele, tecidos moles e infecção de corrente sanguínea) foram obtidas diariamente no laboratório de microbiologia do HC-UFU. O aspirado endotraqueal foi obtido a partir de pacientes com diagnóstico clínico / radiológico de PAV, quando da higiene de rotina do tubo endotraqueal, realizada diariamente por enfermeiros e fisioterapeutas.

Uma ficha clínica e epidemiológica contendo o perfil demográfico e fatores de risco (intrínsecos e extrínsecos) relacionados aos pacientes (Anexo III) foi preenchida para todas as amostras obtidas a partir do laboratório de microbiologia e para as coletas realizadas na UTI. As informações para o preenchimento das fichas foram obtidas no Setor de Prontuários do HC-UFU.

### 3.4- Definições

**CA-MRSA:** MRSA de origem comunitária isolado de infecções em pacientes sem fatores de risco clássicos, com perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos considerados como marcadores fenotípicos e carreando *SCCmecIV* ou *V* (MILLAR *et al.*, 2007).

**HA-MRSA:** MRSA isolado a partir de infecções em pacientes com pelo menos um fator de risco, usualmente multirresistente e carreando *SCCmecI*, *II*, *III* ou *IV* (MILLAR *et al.*, 2007; OTTER e FRENCH, 2010).

**Infecção Hospitalar:** é definida pelo “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) como toda infecção adquirida 72 horas após a admissão do paciente no hospital ou após 48 horas, quando da presença de cateter vascular central ou prótese ventilatória, e que se manifeste durante o tempo de internação ou após a alta, quando esta puder ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares (HORAN, ANDRUS & DUDECK *et al.*, 2008).

**Infecção comunitária:** é definida pelo CDC (“Center for Disease Control and Prevention”) como toda infecção diagnosticada microbiologicamente nas primeiras 48 horas de internação quando, não puder ser associada a internações ou procedimentos hospitalares prévios (GARNER *et al.*, 1988).

**Pneumonia associada a ventilação mecânica:** toda pneumonia diagnosticada através de critérios clínicos, radiológicos, laboratoriais e microbiológicos, sendo este, por meio de cultura quantitativa de aspirado endotraqueal com contagem  $\geq 10^6$  UFC/mL (HUNTER, 2006).

**Bacteremia / Seps primária:** definida pela presença de pelo menos um dos sinais e sintomas relacionados: febre, hipotensão, oligúria, quando de cultura de sangue positiva, sem outros focos reconhecidos. (HORAN, ANDRUS, DUDECK *et al.*, 2008).

**Bacteremia / Seps secundária:** Definida como a seps que ocorre na presença de um sítio anatômico extra-vascular infectado (EGGIMANN & PITTET, 2002).

**Infecção de pele e tecidos moles:** lesões com drenagem purulenta, febre, dor e rubor no local; a cultura da secreção, quando do isolamento de microrganismos deve ser em cultura pura, ou isolamento de microrganismo no sangue (MAYHALL, 2004).

**Infecção de sítio cirúrgico incisional superficial:** infecções diagnosticadas no período de 30 dias após a cirurgia desde que a infecção esteja localizada apenas em pele ou tecido subcutâneo no local da incisão, apresentando drenagem purulenta e com características clínicas de febre, rubor e edema (MANGRAM *et al.*, 1999).

### 3.5- Técnicas microbiológicas

#### 3.5.1- Coleta

Os isolados de *S. aureus* a partir de infecções de pele e tecido mole, sangue e infecção de sítio cirúrgico (ISC) foram obtidos no laboratório de microbiologia do hospital.

As amostras de aspirado endotraqueal foram coletadas em frascos estéreis e transportadas ao laboratório de ensino da UFU sendo submetidas a diluições decimais em tubos contendo salina estéril.

### **3.5.2- Cultivo primário**

As amostras de *S. aureus* obtidas a partir do laboratório do HC-UFU foram estocadas em tubos contendo caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) e glicerol (10,0%) e congeladas a -20°C para posterior estudo.

As amostras clínicas de secreção traqueal e suas respectivas diluições (1:1000 e 1:10.000) foram inoculadas em Ágar BHI (“Brain Heart Infusion”) e incubadas a 37 ° C por 24-48 horas e, as placas contendo colônias com contagens  $\geq 10^6$  UFC/mL foram, novamente, subcultivadas em Ágar TSA (“Tryptic Soy Agar”) e após crescimento as colônias sugestivas de *Staphylococcus* foram submetidas aos testes fenotípicos para identificação realizada pelas características morfo-tintoriais (coloração de Gram), fermentação do manitol, e teste de coagulase ligada, e estocadas como descrito no parágrafo anterior.

### **3.5.3- Sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos**

- **Teste de triagem em ágar incorporado de oxacilina e NaCl**

Foram utilizadas placas de ágar Mueller-Hinton contendo 6 µg de oxacilina por mL e 4,0% de NaCl onde foram cultivadas as amostras de *S. aureus* para a identificação daquelas resistentes à oxacilina, de acordo com as indicações do “Clinical Laboratory Standards Institute” – CLSI (2008). Os inóculos foram preparados por subcultivo em caldo Mueller-Hinton e os “spots”, correspondendo a 0,1 mL de cada isolado, aplicados na superfície do ágar com o auxílio do aplicador de Steers. As placas foram incubadas a 35° C por 24 horas e a leitura definida pela presença (resistência) ou ausência (sensibilidade) de crescimento. Os controles

utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC29213, como amostra sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC43300, como amostra resistente.

- **Teste de difusão em ágar** – segundo a técnica do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

As amostras foram subcultivadas em “Tryptic Soy Agar” (TSA) e incubadas a 37 ° C por 24 – 48 horas. Três ou quatro colônias representativas foram semeadas em caldo “Tryptic Soy Broth” (TSB) e novamente incubadas a 37 ° C até a turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala MacFarland ( $1 - 2 \times 10^8$  UFC/mL) e semeadas com o auxílio de “swab” estéril na superfície do ágar Mueller-Hinton. Os discos de antimicrobianos foram posicionados e as placas incubadas a 35°C por 24 horas. A sensibilidade foi testada para: oxacilina (1µg), clindamicina (2 µg), levofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25µg), e vancomicina (30µg). Foi usada como controle a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

Foram considerados como não-multirresistentes (não-MR-MRSA) as amostras susceptíveis a mais de três classes de antimicrobianos, particularmente, aqueles considerados como marcadores fenotípicos do microrganismo comunitário: sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina, tetraciclina, clindamicina e levofloxacina.

- **Determinação da Concentração Inibitória Mínima** – segundo a técnica do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)

As amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina e sensíveis a mais de três antimicrobianos foram selecionadas e subcultivadas em “Tryptic Soy Agar” (TSA) e, após o crescimento, duas a três colônias diluídas em salina estéril até atingirem a turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala MacFarland. As amostras foram

semeadas na superfície do ágar com o auxílio de swabs estéreis e as fitas de E-teste, posicionadas na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35 ° C por 24 horas e, após este período realizada a leitura do teste. Os controles utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, como amostra sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, como amostra resistente.

### **3.6- Técnicas moleculares**

Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elsa Massae Mamizuka.

#### **3.6.1- Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da presença dos genes *mecA*, regulatórios (*mecI* / *mecR1*), *IS1272* e *ccr* pertencentes ao SCC*mec***

##### **▪ Extração do DNA bacteriano**

A extração foi ser realizada por lise térmica após o subcultivo em tubo com 5 mL de caldo TSB (“Tryptic Soy Broth”). Uma alíquota de 1 mL de suspensão resultante foi submetida a centrifugação por 4 minutos a 2500 x g, e o sobrenadante descartado; o sedimento lavado três vezes em 1 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e ressuspenso em 100 µL deste mesmo tampão. A suspensão resultante foi mantida à temperatura de 100°C por 10 minutos e em seguida centrifugada por 30 segundos a 9000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas reações de PCR.

##### **▪ Reações de PCR**

A presença dos genes foi confirmada pela amplificação dos fragmentos correspondentes utilizando o kit NCL-AS-OS (Novo Castra, United Kingdom) como

descrito por Okuma *et al.* (2002), com a utilização dos “primers” descritos na Tabela 1.

Tabela 1. “Primers” utilizados nas reações de PCR

| Estrutura                  | Iniciador | “Primer”                                 | Tamanho Fragmento |
|----------------------------|-----------|------------------------------------------|-------------------|
| <i>mecA</i>                | mA1       | 5'- TGC TAT CCA CCC TCA AAC AGG – 3'     | 200 bp            |
|                            | mA2       | 5'- AAC GTT GTA ACC ACC CCA AGA – 3'     |                   |
| <i>mecI</i> / <i>mecR1</i> | mI4       | 5'- CAA GTG AAT TGA AAC CGC CT – 3'      | 180 bp            |
|                            | McR5      | 5'- CAG GGA ATG AAA ATT ATT GGA – 3'     | 320 bp            |
| <i>ccr</i>                 | Bc (B2)   | 5'- ATT GCC TTG ATA ATA GCC TCT – 3'     | 560 bp            |
|                            | a1 (a2)   | 5'- AAC CTA TAT CAT CAA TCA GTA CGT – 3' | 700 bp            |
|                            | a2 (a3)   | 5'- TAA AGG CAT CAA TGC ACA AAC ACT – 3' | 1 kbp             |
|                            | a3 (a4)   | 5'- AGC TCA AAA GCA AGC AAT AGA AT – 3'  | 1,6 kbp           |
| IS1272                     | IS5       | 5'- AAC GCC ACT CAT AAC ATA TGG AA – 3'  | 2 kbp             |
|                            | MA6       | 5'- TAT ACC AAA CCC GAC AAC – 3'         |                   |

Os tubos contendo 50 µ L desta solução foram adicionados de 50 µ L do DNA extraído por lise térmica e processados em um termociclador (*Gene Amp PCR System 2400*– Applied Biosystems) como descrito a seguir: pré-desnaturação a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação, cada um consistindo de 95° C por 30 segundos, 50° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72° C. Posteriormente, 10µL deste material foi aplicado em gel de agarose (AcaKem LE 2,0%) e visualizado após coloração do gel com brometo de etídio sob luz ultravioleta (UV).

▪ **Reação em cadeia de Polimerase (PCR) para amplificação de estruturas gênicas que codificam fatores de virulência**

A tabela 2 mostra os “primers” utilizados nas reações para identificação dos genes que codificam a produção de leucocidina Panton-Valentine e Hemolisina A.

Para amplificação das estruturas gênicas foi utilizado o protocolo descrito por Okuma *et al.* (2002): um volume de 20 µL de uma mistura para reação contendo 2 µL de DNA, 0,5 U de *Taq* polimerase, 200µM de cada dNTP; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 75mM Tris-HCl pH 9,0; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01%Tween 20; 250 nM de cada um dos iniciadores. As reações foram amplificadas no termociclador (*Gene Amp PCR System 2400*– Applied Biosystems) como descrito a seguir: pré-desnaturação a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação, cada um consistindo de 95° C por 30 segundos, 55° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72° C. Posteriormente, 10µL deste material foi aplicado em gel de agarose (AcaKem LE 2,0%) e visualizado após coloração do gel com brometo de etídio sob luz ultravioleta (UV).

Tabela 2. “Primers” utilizados nas reações de PCR (REINERT, 2006)

| Toxina           | Iniciador | Sequência (5' – 3')                       | Cepa Padrão |
|------------------|-----------|-------------------------------------------|-------------|
| Leucocidina      | PVL1      | ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A | MR 108      |
| Panton Valentine | PVL2      | GCA TCA AAT GTA TTG GAT AGC AAA AGC       |             |
| Leucocidina      | LUKDE1    | TGA AAA AGG TTC AAA GTT GAT ACG AG        | N315        |
| Panton Valentine | LUKDE2    | TGT ATT CGA TAG CAA AAG CAG TGC A         |             |
| Hemolisina A     | HLA1      | CTG ATT ACT ATC CAA GAA ATT CGA TTG       | N315        |
|                  | HLA2      | CTT TCC AGC CTA CTT TTT TAT CAG T         |             |

### 3.6.2- Tipagem molecular pela técnica de Eletroforese em campo pulsátil - PFGE

As oito amostras identificadas como SCCmecIV foram submetidas ao PFGE conforme a técnica descrita por PFALLER et al. (1993). As amostras foram cultivadas

em ágar sangue por 24 horas e, após este período algumas colônias foram repicadas em 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37° C durante 24 horas com agitação constante, de modo a atingirem sua fase exponencial de crescimento. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 2 minutos a 12.000 rpm a 4°C. As células foram lavadas em 500µL de PIV (10Mm Tris, 1.0M NaCl), novamente centrifugadas, e o sobrenadante descartado. O “pellet” foi ressuspenso em 200µL de PIV e 150µL da suspensão transferido para um novo tubo eppendorf e colocado em banho maria à 48°C por 5 a 10 minutos para o equilíbrio da temperatura. Em seguida, 150µL de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure), foi adicionada ao tubo.

Os discos de agarose foram colocados em solução de lise EC acrescentando-se RNase a uma concentração final de 20µg/mL e incubados por 4 a 5 horas a 37° C. Ao final deste período, o tampão EC foi substituído por tampão ES acrescido de proteinase K, incubando-se por um período de 18-24 horas a 50° C. Os discos de agarose foram lavados 5 vezes com 13mL do tampão TE por 30 minutos. Um único disco foi colocado em 100µL de tampão e deixado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por tampão fresco e adicionado 30 unidades de enzima de restrição SmaI seguindo-se incubação em banho maria por 18 a 20 horas a 37°C. O gel de agarose (Agarose Ultra Pure) (150mL a 1,0%) em TBE 0,5x.

A eletroforese foi realizada em aparelho Gene Navigator, utilizando-se o tampão TBE 0,5x e a temperatura de 14°C por 20 horas e 1 minuto, com pulsos de 5 segundos por 20 horas e 15 segundos por 1 minuto utilizando-se uma corrente elétrica de 164V, no modo interpolation. Após esse procedimento o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) por 30 minutos, descorado em água destilada por 30 minutos e fotografado com filme Photoman. Como padrão de massa molecular foi utilizado o concatâmero de λ DNA *Ladder* (Pharmacia), com extensão das bandas de 48,5 kb.

A análise das bandas obtidas após a eletroforese foi realizada visualmente por mais de um observador de acordo com o guia de interpretação de Eletroforese de campo pulsado proposto por TENOVER et al. (1995, 1997) como mostrado na Tabela 2.

Tabela 3. Critérios para interpretação de Eletroforese de campo pulsado

| Categorias                 | N          | de N     | de N       | Interpretação                                                            |
|----------------------------|------------|----------|------------|--------------------------------------------------------------------------|
|                            | diferenças |          | fragmentos |                                                                          |
|                            | genéticas  |          | diferentes |                                                                          |
| Semelhantes                | 0          | 0        |            | Cepas fazem parte do mesmo clone                                         |
| Relacionadas               | 1          | 2-3      |            | Cepas são consideradas como subtipos                                     |
| Possivelmente relacionadas | 2          | 4-6      |            | Cepas possivelmente relacionadas com o clone com o qual foram comparadas |
| Diferentes                 | $\geq 3$   | $\geq 7$ |            | Cepas são diferentes                                                     |

### 3.6.3- Tipagem molecular pela técnica de “Multilocus sequene typing”

Sete genes foram amplificados de acordo com a técnica: arc (carbamato quinase), aroE (Chiquimato desidrogenase), glpf (glicerol quinase), gmk (guanilato quinase), pta (fosfato acetiltransferase), tpi (triosefosfato isomerase) e yqil (acetil coenzima A acetiltransferase) (Enright et al., 2000). A amplificação foi realizada através da *Triple Master® PCR System* (Eppendorf, Hamburg, Germany). As reações foram amplificadas no termociclador *Perkin-Elmer Gene Amp 2400* e suas condições foram as seguintes: um ciclo de 94° C / 5 min seguido de 30 ciclos de 94° C / 1 min, 55° C / 1 min e 72° C por 1 minuto. A reação foi concluída com um ciclo de 72° C / 5 min.

Após amplificação, os produtos do PCR foram purificados utilizando o kit *Wizard®SV Gel e PCR Clean-up System* (Promega, Madison, EUA).

Após as reações de sequenciamento de cada um dos genes (“forward” e “reverse”) as seqüências gênicas foram identificadas através da comparação cós as seqüências disponíveis na base de dados acessível em [www.mlst.net](http://www.mlst.net).

### **3.7- Análise Estatística**

As análises estatísticas univariada, através de tabela 2 x 2 e teste-t, e multivariada, por regressão logística múltipla, foram realizadas pelo programa BioEstat5.0.

### **3.8- Aprovação pelo Comitê de Ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFU conforme documento em anexo (Anexo I) sob o número de registro: 218/06

## 4 – Resultados

No período da investigação, entre os meses de setembro de 2006 e setembro de 2008, foram registrados 633 episódios de infecções por *Staphylococcus aureus*, dos quais episódios, foram excluídas 141 amostras por serem duplicatas de pacientes (93) e pela falta de dados (48). No total foram incluídas no estudo 492 amostras: 286 (58,0%) de MSSA e 206 (42,0%) de MRSA; e, as últimas, subdivididas como multirresistentes (MR-MRSA) e não multirresistentes (não MR-MRSA) (Tabela 1).

Tabela 1. Infecções por amostras de *Staphylococcus aureus* susceptíveis ou resistentes à metilicina em pacientes internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| <b><i>S. aureus</i></b>  | <b>Número de amostras / infecções (%)</b> |
|--------------------------|-------------------------------------------|
|                          | <b>492 (100)</b>                          |
| MSSA                     | 286 (58,0)                                |
| MRSA                     | 206 (42,0)                                |
| MR-MRSA <sup>a</sup>     | 161 (78,1)                                |
| Não MR-MRSA <sup>b</sup> | 45 (21,9)                                 |

<sup>a</sup>: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina multirresistente, <sup>b</sup>: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina não-multirresistente

Tabela 2. Sítios de infecção MRSA em pacientes internados no HC-UFU, de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| <b>Sítio de Infecção</b> | <b>N=206 (%)</b> |
|--------------------------|------------------|
| Corrente sanguínea       | 89 (43,2)        |
| Sítio Cirúrgico          | 56 (27,2)        |
| Pneumonia                | 38 (18,4)        |
| Pele e tecido mole       | 23 (11,1)        |

As infecções por MRSA foram predominantemente de corrente sanguínea (43,2%), sítio cirúrgico (27,2%) e pneumonia (18,4%) e, excetuando-se quatro, de natureza hospitalar, tanto por MR quanto por não MR-MRSA (Tabelas 2 e 3). As infecções de natureza comunitária responderam por apenas 1,9% do total. Observou-se predomínio de óbitos entre pacientes com infecção pelo microrganismo multirresistente ( $P \leq 0,01$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação das infecções por *Staphylococcus aureus* em pacientes internados no HC-UFU, quanto à origem e evolução clínica dos pacientes, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Característica | MRSA                 |                         | P    | OR (IC 95%)      |
|----------------|----------------------|-------------------------|------|------------------|
|                | MR-MRSA<br>N=161 (%) | Não MR-MRSA<br>N=45 (%) |      |                  |
| Comunitária    | 2 (1,2)              | 2 (4,4)                 | 0,20 | 0,27 (0,03-2,80) |
| Hospitalar     | 159 (98,8)           | 43 (95,6)               | 0,20 |                  |
| Evolução       |                      |                         |      |                  |
| Alta           | 84 (52,2)            | 33 (73,4)               | 0,01 | 0,40 (0,18-0,87) |
| Óbito          | 77 (47,8)            | 12 (26,6)               | 0,01 |                  |

Os fatores de risco relativos aos pacientes e tipos de infecções associados aos dois microrganismos (MR-MRSA e não MR-MRSA) são mostrados na tabela 4, observando-se significância ( $p < 0,05$ ) de infecções de sítio cirúrgico e pneumonia por ventilação mecânica no grupo de infectados por MR-MRSA enquanto no grupo não MR-MRSA houve predomínio de infecções de pele e tecidos moles, quando da análise univariada. Também entre os fatores intrínsecos foi avaliada a presença de comorbidades (cardiopatia, DPOC, diabetes mellitus, nefropatia, neoplasias e imunocomprometimento), presentes na metade (49,7%) dos pacientes com infecção por

MR-MRSA e em 46,6% daqueles infectados com amostras não MR-MRSA. Entretanto, embora fossem mais frequentes as infecções por MR-MRSA em pacientes com diabetes mellitus (OR=3,86; IC=0,50-81,30), não foram observadas diferenças significativas quanto ao agente etiológico nas frequências observadas destes fatores predisponentes.

Tabela 4. Fatores de risco relacionados aos pacientes para infecção por MR- e não MR-MRSA no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Característica                       | MR-MRSA<br>N=161 | Não MR-MRSA<br>N=45 | P     | OR (IC 95%)        |
|--------------------------------------|------------------|---------------------|-------|--------------------|
| Sexo (M / F)                         | 106 / 55         | 30 / 15             | 0,91  | 0,96 (0,45-2,05)   |
| Idade: média (variação) <sup>a</sup> | 50,1 (0 - 90)    | 27,5 (0 – 85)       | 0,001 | -                  |
| Tempo de internação <sup>b</sup>     | 47,51 (0-348)    | 76,51 (0-1080)      | 1,00  | -                  |
| Sítio de infecção                    |                  |                     |       |                    |
| Corrente Sanguínea                   | 69 (42,8)        | 20 (44,4)           | 0,25  | 0,68 (0,33-1,39)   |
| Pele e tecidos moles                 | 10 (6,2)         | 13 (28,8)           | 0,001 | 0,13 (0,05-0,36)   |
| Sítio cirúrgico                      | 50 (31,0)        | 6 (13,3)            | 0,01  | 3,40 (1,19-10,46)  |
| Pneumonia                            | 12 (7,4)         | 5 (11,1)            | 0,30  | 0,64 (0,19-2,24)   |
| Pneumonia VM                         | 20 (12,4)        | 1 (2,2)             | 0,03  | 6,24 (0,85-128,33) |
| Trauma                               | 47 (29,2)        | 9 (20,0)            | 0,22  | 1,65 (0,70-4,01)   |

<sup>a</sup> Média (variação) em anos; <sup>b</sup> Média (variação) em dias.

A análise dos fatores de risco considerados extrínsecos foi significativa ( $P \leq 0,05$ ) para o grupo com infecção por MR-MRSA em relação aos seguintes itens: cirurgia, uso de cateter vascular periférico e sonda vesical, mais de dois procedimentos invasivos e internação em unidades crítica e cirúrgica. A internação em unidades pediátricas sobressaiu entre os pacientes com infecção por amostra não-multirresistente ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5. Fatores de risco extrínsecos para infecções por amostras MR- e não MR-MRSA diagnosticadas no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Característica                    | MR-MRSA<br>N=161 (%) | Não MR-MRSA<br>N=45 (%) | P     | OR (IC 95%)        |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------------|-------|--------------------|
| Cirurgia                          | 105 (65,2)           | 22 (48,8)               | 0,04  | 1,96 (0,95-4,03)   |
| Procedimento invasivo             |                      |                         |       |                    |
| Cateter vascular central          | 84 (52,2)            | 23 (51,1)               | 0,89  | 1,04 (0,51-2,13)   |
| Cateter vascular periférico       | 63 (39,1)            | 7 (15,5)                | 0,003 | 3,49 (1,38-9,16)   |
| Tubo Endotraqueal                 | 59 (36,6)            | 10 (22,2)               | 0,06  | 2,02 (0,88-4,73)   |
| Sonda Vesical                     | 85 (52,8)            | 14 (31,1)               | 0,01  | 2,48 (1,17-5,32)   |
| > 2 procedimentos invasivos       | 64 (39,7)            | 7 (15,5)                | 0,002 | 3,58 (1,42-9,40)   |
| Antimicrobianos                   | 137 (85,1)           | 38 (84,4)               | 0,91  | 1,05 (0,38-2,82)   |
| > 2 antimicrobianos               | 44 (27,3)            | 15 (33,3)               | 0,43  | 0,75 (0,35-1,63)   |
| Unidade de internação             |                      |                         |       |                    |
| UTI adultos                       | 31 (19,2)            | 3 (6,6)                 | 0,04  | 3,34 (0,91-14,46)  |
| Unidades Cirúrgicas               | 47 (29,2)            | 6 (13,3)                | 0,03  | 2,68 (1,00 – 7,57) |
| Moléstias Infecciosas             | 10 (6,2)             | 1 (2,2)                 | 0,26  | 2,91 (0,37-62,48)  |
| Pronto Socorro                    | 20 (12,4)            | 7 (15,5)                | 0,58  | 0,77 (0,28-2,88)   |
| Unidade de Queimados              | 3 (1,8)              | 0                       | 0,47  | -                  |
| Clínica Médica                    | 29 (18,0)            | 4 (8,8)                 | 0,14  | 2,25 (0,70-8,05)   |
| Unidades pediátricas <sup>a</sup> | 10 (6,2)             | 19 (42,2)               | 0,001 | 0,09 (0,03-0,23)   |
| Ambulatório                       | 10 (6,2)             | 4 (8,8)                 | 0,36  | 0,68 (0,18-2,72)   |
| Indeterminado                     | 1 (0,6)              | 1 (2,2)                 | 0,39  | 0,28 (0,01-10,29)  |

<sup>a</sup> Pediatria, UTI pediátrica, ITU neonatal.

A análise multivariada dos fatores relacionados aos pacientes e extrínsecos nas

infecções pelos microrganismos multirresistentes e não multiresistentes evidenciou, como fatores independentes, pior prognóstico (óbito) para infecções por amostras MR e infecções de pele e tecido mole em neonatos e crianças quando de infecções por amostras não MR de MRSA (Tabela 6).

Tabela 6. Análise multivariada dos fatores de risco para infecções por amostras MR- e não MR-MRSA diagnosticadas no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Fator de risco                     | <i>P</i> | OR    | IC 95%      |
|------------------------------------|----------|-------|-------------|
| Infecções de pele e tecido mole    | 0,01     | 0,226 | 0,07 – 0,74 |
| Infecção de Sítio Cirúrgico        | 0,49     | 1,532 | 0,45 – 5,19 |
| Uso de CVC                         | 0,31     | 0,590 | 0,21 – 1,65 |
| Uso de > 2 procedimentos invasivos | 0,96     | 0,972 | 0,28 – 3,40 |
| Cirurgia                           | 0,19     | 1,863 | 0,73 – 4,73 |
| Internação prévia em UTI           | 0,35     | 2,020 | 0,46 – 8,86 |
| Internação em unidades pediátricas | < 0,001  | 0,101 | 0,03 – 0,33 |
| Evolução para óbito                | 0,01     | 3,04  | 1,20 – 7,69 |

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que todas as amostras de MR-MRSA exibem resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos, excluídos os  $\beta$ -lactâmicos, contra 82,2% das amostras não MR-MRSA (Tabela 7). Quando da avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos considerados como marcadores fenotípicos para CA-MRSA verificou-se, no grupo não MR-MRSA, susceptibilidade superior a 60,0% para: levofloxacina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina, tetraciclina, rifampicina. Cabe assinalar que todas as amostras de MR-MRSA foram susceptíveis à Vancomicina e a maioria à Rifampicina

(70,0%) e Cloranfenicol (68,3%). Os resultados obtidos pelo E-test mostraram resistência entre 1-2 µg/mL em 75% das amostras. Em apenas duas amostras, 455 e 321, o MICs foi mais elevado, 50 e 75 µg/mL, respectivamente.

Tabela 7. Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de amostras MR- e não MR-MRSA isolados de pacientes internados no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Antimicrobiano       | MR-MRSA<br>N=161 (%) | Não MR-MRSA<br>N=45 (%) | P       | OR (IC)            |
|----------------------|----------------------|-------------------------|---------|--------------------|
| Eritromicina         | 7 (4,3)              | 5 (11,1)                | 0,09    | 0,36 (0,10 – 1,41) |
| Levofloxacina        | 62 (38,5)            | 30 (66,6)               | 0,001   | 0,31 (0,15 – 0,66) |
| Clindamicina         | 12 (7,4)             | 17 (37,7)               | < 0,001 | 0,13 (0,05 – 0,33) |
| Tetraciclina         | 19 (11,8)            | 42 (93,3)               | < 0,001 | 0,01 (0,00 – 0,04) |
| Gentamicina          | 24 (14,9)            | 41 (91,1)               | < 0,001 | 0,02 (0,00 – 0,06) |
| Rifampicina          | 113 (70,2)           | 42 (93,3)               | 0,003   | 0,17 (0,04 – 0,62) |
| Sulfazotrim          | 15 (9,3)             | 41 (91,1)               | < 0,001 | 0,01 (0,00 – 0,03) |
| Cloranfenicol        | 110 (68,3)           | 37 (82,2)               | 0,10    | 0,47 (0,19 – 1,14) |
| Vancomicina          | 161 (100)            | 45 (100)                | -       | -                  |
| Resistência $\geq 3$ | 161 (100)            | 38 (84,4)               | < 0,001 | -                  |

Entre as quarenta e cinco amostras não MR-MRSA 26 (57,8%) foram testadas quanto ao tipo de *SCCmec* e a presença de genes para a produção de fatores de virulência, sendo apenas oito (17,7%) classificadas como do tipo IV e as restantes como dos tipos II e III (82,3%). As classificadas como *SCCmec* IV foram isoladas principalmente de infecções de corrente sanguínea (37,5%) e pneumonias (25,0%) (Tabela 8). Neste grupo o espectro de resistência foi predominantemente à eritromicina

(37,5%). Quatro amostras (50,0%) exibiram resistência à clindamicina associada a este macrolídeo (Tabela 8).

Tabela 8. Características das amostras de *Staphylococcus aureus* SCCmec tipo IV isoladas no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Amostra | Data de<br>isolamento | Sítio de infecção | Perfil de resistência               | SCCmec |
|---------|-----------------------|-------------------|-------------------------------------|--------|
| 229     | 25/05/2007            | Pele              | ERI <sup>2</sup> , CLI <sup>3</sup> | IV     |
| 321     | 18/09/2007            | Sangue            | ERI                                 | IV     |
| 333     | 20/09/2007            | Sangue            | ERI, CLO <sup>4</sup>               | IV     |
| U70     | 04/03/2008            | Aspirado traqueal | ERI, CLI, LEVO <sup>5</sup> , CLO   | IV     |
| 455     | 17/03/2008            | Aspirado traqueal | ERI, CLI, LEVO                      | IV     |
| 495     | 06/05/2008            | Sangue            | ERI                                 | IV     |
| 508     | 21/05/2008            | Secreção (Otite)  | ERI, CLO, CLI                       | IV     |
| 533     | 18/06/2008            | ISC <sup>1</sup>  | ERI                                 | IV     |

ISC<sup>1</sup> – Infecção de Sítio Cirúrgico; <sup>2</sup>Eritromicina, <sup>3</sup>Clindamicina, <sup>4</sup>Cloranfenicol, <sup>5</sup>Levofloxacina

Os fatores de risco intrínsecos e extrínsecos observados nos pacientes com infecções por amostras SCCmecIV, mostrados, respectivamente, nas tabelas 9 e 10, revelam o predomínio do sexo masculino (87,5%), com idade inferior a um ano (50,0%) e apenas um dos pacientes (12,5%) com infecção de natureza comunitária (Tabela 9).

Tabela 9. Fatores de risco relacionados aos pacientes com infecção por *Staphylococcus aureus* SCCmec tipo IV isolados no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Amostra | Sexo      | Idade<br>(anos) | Internação<br>anterior | Trauma | Comorbidades | Origem      |
|---------|-----------|-----------------|------------------------|--------|--------------|-------------|
| 229     | Masculino | 0,05            | Não                    | Não    | -            | Hospitalar  |
| 321     | Masculino | 0,66            | Sim                    | Não    | Cardiopatia  | Hospitalar  |
| 333     | Masculino | 0,7             | Não                    | Não    | Cardiopatia  | Hospitalar  |
| U70     | Masculino | 62              | Não                    | Sim    | -            | Hospitalar  |
| 455     | Masculino | 62              | Não                    | Sim    | -            | Hospitalar  |
| 495     | Feminino  | 25              | Sim                    | Não    | SIDA         | Hospitalar  |
| 508     | Masculino | 1               | Não                    | Não    | -            | Comunitária |
| 533     | Masculino | 43              | Sim                    | Sim    | -            | Hospitalar  |

Os fatores predisponentes extrínsecos relacionados com infecções por estas amostras são mostrados na tabela 10, destacando-se a distribuição abrangente (unidades críticas e não críticas) no hospital, além de, predomínio de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos (62,5%) e invasivos (75,0%), bem como em uso de duas ou mais classes de antimicrobiano (62,5%).

Tabela 10. Fatores de risco extrínsecos para infecção por amostras de *Staphylococcus aureus* SCCmec tipo IV isoladas no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Amostra | Unidade de<br>internação <sup>1</sup> | Cirurgia | Procedimentos invasivos <sup>2</sup> | Uso de<br>Antimicrobianos <sup>3</sup> |
|---------|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| 229     | Neonatologia                          | Não      | CVC                                  | OXA, AMC, VAN                          |
| 321     | Ambulatório                           | Sim      | -                                    | VAN, MER                               |
| 333     | Neonatologia                          | Sim      | CVC, CVP                             | VAN, MER                               |
| U70     | UTI                                   | Sim      | CVC, TET, SV                         | CLI, CEF                               |
| 455     | UTI                                   | Sim      | CVC, TET, SV                         | VAN                                    |
| 495     | MI                                    | Não      | CVP                                  | VAN                                    |
| 508     | Ambulatório                           | Não      | -                                    | CTX, AMX, CLV                          |
| 533     | PS                                    | Sim      | CVP                                  | -                                      |

<sup>1</sup>UTI- Unidade de Terapia Intensiva de Adultos, MI- Moléstias Infecciosas, PS- Pronto Socorro; <sup>2</sup> CVC- Cateter Vascular Central, CVP- Cateter Vascular Periférico, TET- Tubo Endotraqueal, SV- Sonda Vesical; <sup>3</sup> CLI – Clindamicina; CEF – Cefepime; OXA – Oxacilina; AMC – Amicacina; VAN – Vancomicina; MER – Meropenem; CTX – Ceftriaxone; AMX – Amoxicilina; CLV – Clavulin

Tabela 11. Fatores de risco intrínsecos relacionados aos pacientes com infecção por amostras de MRSA *versus* MRSA SCCmec IV no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Características                      | MRSA<br>N=198  | MRSA<br>SCCmecIV<br>N=8 | P     | OR (IC 95%)       |
|--------------------------------------|----------------|-------------------------|-------|-------------------|
| Sexo (M / F)                         | 130 / 68       | 7 / 1                   | 0,18  | 0,27 (0,01-2,28)  |
| Idade: média (variação) <sup>a</sup> | 50,1 (0 - 90)  | 24,12 (0 – 62)          | 0,013 | -                 |
| Tempo de internação <sup>b</sup>     | 53,09 (0-1080) | 67 (0-360)              | 1,00  | -                 |
| Sítio de infecção                    |                |                         |       |                   |
| Corrente sanguínea                   | 86 (43,4)      | 3 (37,5)                | 0,51  | 1,28 (0,26-6,97)  |
| Pele e tecidos moles                 | 21 (10,6)      | 2 (25,0)                | 0,22  | 0,36 (0,06-2,74)  |
| Sítio cirúrgico                      | 55 (27,7)      | 1(12,5)                 | 0,30  | 2,69 (0,32-59,56) |
| Pneumonia                            | 16 (8,0)       | 1 (12,5)                | 0,50  | 0,62 (0,07-14,13) |
| Pneumonia VM                         | 20 (10,1)      | 1 (12,5)                | 0,58  | 0,79 (0,09-17,87) |
| Comorbidades:                        |                |                         |       |                   |
| Cardiopatia                          | 16 (8,0)       | 2 (25,0)                | 0,14  | 0,26 (0,04-2,07)  |
|                                      | 10 (5,0)       | 1 (12,5)                | 0,26  | 2,91 (0,37-62,48) |
| Imunocomprometimento                 | 73 (36,8)      | 0                       | 0,001 | -                 |
| Outras <sup>1</sup>                  |                |                         |       |                   |
| Trauma                               | 53 (26,8)      | 3 (37,5)                | 0,37  | 0,61 (0,12-3,35)  |

<sup>a</sup> Média (variação em anos), <sup>b</sup> Média (variação) em dias, <sup>1</sup>Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, Nefropatia, Diabetes Mellitus, Neoplasia

A comparação de fatores de risco inerentes aos pacientes com infecção por MRSA ou

MRSA SCCmec IV (Tabela 11) mostrou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando da análise univariada para os seguintes itens: idade, infecções graves (infecção de corrente sanguínea e pneumonias) e de sítio cirúrgico e trauma ( $P < 0,05$ ), mais expressivos no primeiro grupo de pacientes, excetuando-se as pneumonias, com ( $P = 0,05$ ) e sem ( $P = 0,03$ ) ventilação mecânica, que foram mais frequentes entre os pacientes com infecção por SCCmec IV.

Embora várias características inerentes ao paciente fossem significativas quando da comparação de infecções por amostras de MRSA *versus* SCCmec IV, como referido anteriormente, quando da análise univariada o mesmo não foi observado para as variáveis extrínsecas (Tabela 12). A análise multivariada dos itens com significância na univariada não foram independentemente associados com os dois grupos. Por outro lado os sítios de infecção observados apresentaram valores de OR altos, a saber: Infecções de sítio cirúrgico (10,663), infecções de corrente sanguínea (3,332) nos pacientes com infecções pelos SCCmec tipos II e III, e pneumonias (2,753) nos infectados por SCCmec IV (Tabela 13).

Tabela 12. Fatores de risco extrínsecos para infecções por MRSA *versus* MRSA SCCmec IV diagnosticadas no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Característica              | MRSA<br>N=198 | MRSA<br>SCCmec IV<br>N=8 | P     | OR (IC 95%)       |
|-----------------------------|---------------|--------------------------|-------|-------------------|
| Cirurgia                    | 123 (62,1)    | 4 (50,0)                 | 0,36  | 1,64 (0,33-8,09)  |
| Procedimento invasivo       |               |                          |       |                   |
| Cateter vascular central    | 103 (52,0)    | 4 (50,0)                 | 0,59  | 1,08 (0,22-5,33)  |
| Cateter vascular periférico | 67 (34,0)     | 3 (37,5)                 | 0,53  | 0,85 (0,17-4,66)  |
| Tubo Endotraqueal           | 67 (34,0)     | 2 (25,0)                 | 0,46  | 1,53 (0,27-11,32) |
| Sonda Vesical               | 97 (49,0)     | 2 (25,0)                 | 0,16  | 2,88 (0,51-21,19) |
| > 2 procedimentos invasivos | 69 (34,8)     | 2(25,0)                  | 0,43  | 1,60 (0,28-11,84) |
| Antimicrobianos             | 167 (84,3)    | 7 (87,5)                 | 0,63  | 0,77 (NC)         |
| > 2 antimicrobianos         | 57 (28,8)     | 2 (25,0)                 | 0,58  | 1,21 (0,21-8,97)  |
| Unidade de internação       |               |                          |       |                   |
| UTI adultos                 | 32 (16,1)     | 2 (25,0)                 | 0,40  | 0,60 (0,10-4,51)  |
| Moléstias Infecciosas       | 10 (5,0)      | 1 (12,5)                 | 0,36  | 0,37 (0,04-8,82)  |
| Pronto socorro              | 26 (13,1)     | 1 (12,5)                 | 0,71  | 1,06 (0,12-23,81) |
| Ambulatório                 | 12 (6,0)      | 2 (25,0)                 | 0,09  | 0,19 (0,03-1,56)  |
| Unidades Pediátricas        | 27 (13,6)     | 2 (25,0)                 | 0,31  | 0,47 (0,08-3,59)  |
| Outras <sup>1</sup>         | 91 (46,0)     | 0                        | 0,008 | -                 |

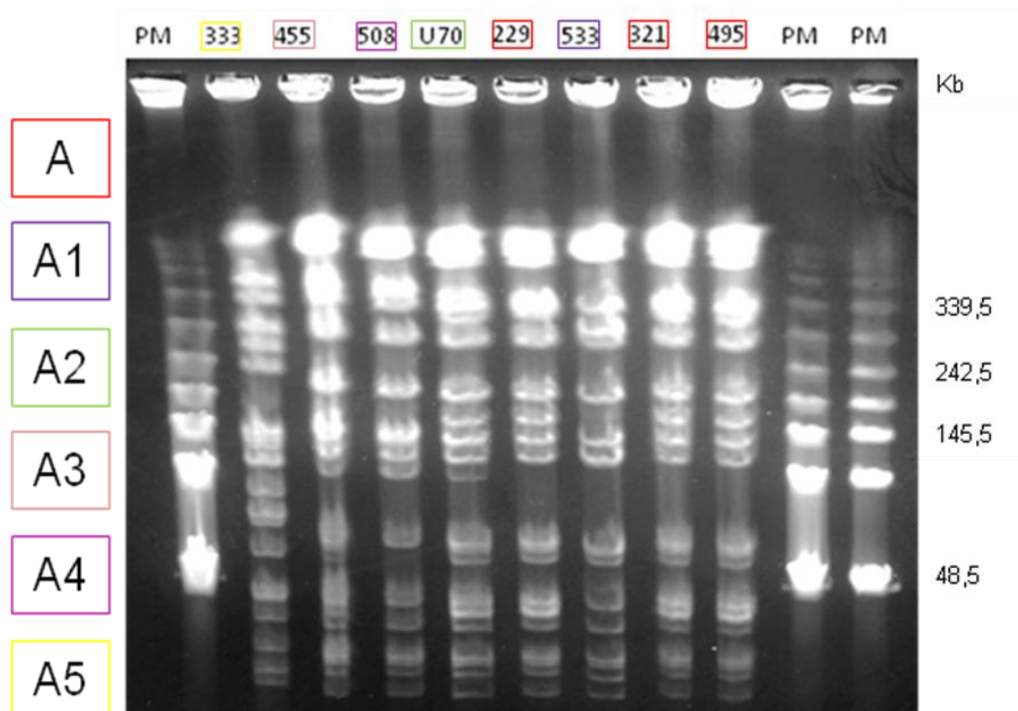
<sup>1</sup> Unidades Cirúrgicas (Cirúrgica I, Cirúrgica II e Cirúrgica III), Clínica Médica e Unidade de Queimados e indeterminados

Tabela 13. Análise multivariada dos fatores intrínsecos de risco para infecções por MRSA SCCmec IV versus SCCmecII / III diagnosticadas no HC-UFU, no período de setembro de 2006 a setembro de 2008.

| Fatores de risco                | <i>P</i> | OR     | IC 95%        |
|---------------------------------|----------|--------|---------------|
| Trauma                          | 0,135    | 0,246  | 0,04 – 1,55   |
| Infecções de Corrente Sanguínea | 0,237    | 3,322  | 0,45 – 24,32  |
| Infecção de Sítio Cirúrgico     | 0,113    | 10,663 | 0,57 – 199,92 |
| Pneumonia                       | 0,409    | 2,753  | 0,25 – 30,47  |
| Comorbidade (Cardiopatia)       | 0,105    | 0,221  | 0,04 – 1,37   |

O perfil alélico obtido pela análise por MLST (1-4-1-4-12-1-10) indicou que as amostras SCCmecIV isoladas em nosso estudo pertencem ao complexo clonal ST5 (CC5), clone USA800, excetuando-se a amostra 333 (Figura 1, linha2) correspondente ao padrão A5 do PFGE que não teve seu ST definido devido a três alelos inconclusivos. A tipagem molecular demonstrou, pela técnica de PFGE, a presença de apenas um clone (A), subdividido em seis subtipos (Figura 1), sendo “A” (padrão) o mais freqüente, correspondendo às amostras 229, 321 e 495, recuperadas de episódios de infecção de pele e tecido mole (229) e de corrente sanguínea (321 e 495). Os outros subtipos discriminados (A1, A2, A3, A4 e A5) foram representados por apenas uma amostra cada.

Figura 3. Genótipos do PFGE das oito amostras não-MR MRSA, *SCCmecIV*, isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da UFU. Amostras - linhas 2 a 9;  $\lambda$  ladder - linhas 1, 10 e 11. Padrão A (linhas 6, 8 e 9), padrão A1 (linha 7), padrão A2 (linha 5), padrão A3 (linha 3), padrão A4 (linha 4) e padrão A5 (linha 2).



## 5 – Discussão

Neste estudo detectamos uma frequência baixa de amostras não MR-MRSA, incluindo amostras SCCmecIV, associadas à infecções hospitalares quando comparadas às frequências relatadas nos Estados Unidos. Adicionalmente, merece destaque a prevalência de apenas um clone entre as mesmas tanto pela técnica MLST (ST5) e quanto pela de PFGE (A).

A incidência de infecções hospitalares por MRSA varia de um país para outro com frequências baixas no norte da Europa (Suíça e Holanda) e altas nos Estados Unidos e Japão (DEURENBERG *et al.*, 2007; VAN TRIJP *et al.*, 2007; KLEVENS *et al.*, 2007). Outros dados de prevalência de HA-MRSA referem taxas de 23,0% na Austrália, 67,0% no Japão, 40,0% no Pacífico Sul, 32,0% nos EUA e 26,0% na Europa (DIEKEMA *et al.*, 2001). Dados do SENTRY -“Antimicrobial Surveillance Program”, relativos à América Latina no período de 1997 a 2001, mostraram a participação de MRSA como agente etiológico, respectivamente, de bacteremias e pneumonias hospitalares em 35,0% e 56,7% (América Latina) e 35,2% e 52,4% (Brasil) (SADER *et al.*, 2004). Entretanto, estas frequências variam significativamente de hospital para hospital, mesmo considerando um país específico (SADER *et al.*, 2004), tornando-se importante o levantamento da epidemiologia local, sobretudo para um tratamento empírico mais efetivo. Gales *et al.* (2004) relataram que MRSA é responsável por 37,0% das infecções por *S. aureus* em pacientes hospitalizados no país. No entanto, em alguns hospitais esta taxa é maior, como em São Paulo onde foram detectados de 60,0 a 70,0% de infecções por este microrganismo (TRINDADE *et al.*, 2005). Aproximadamente 20,0% dos hospitais brasileiros estão localizados no estado de São Paulo, com este microrganismo restrito àqueles de grande porte e universitários (PADOVEZE *et al.*, 2010). No Hospital de Clínicas da Universidade Federal de

Uberlândia, onde foi realizado o presente estudo, 63,7% de infecções de corrente sanguínea e 46,7% das pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV's) por *S. aureus* foram atribuídas a MRSA (CARVALHO & GONTIJO FILHO, 2007). Em outra investigação (MOREIRA & GONTIJO FILHO, 2008), considerando apenas PAVs em pacientes internados na UTI do mesmo hospital relataram uma participação significativa de *S. aureus*, com 41,2% das amostras correspondendo a MRSA.

Neste estudo, considerando apenas infecções de corrente sanguínea, a avaliação de 51 amostras recuperadas de pacientes hospitalizados revelaram proporção semelhantes de infecções por MRSA (56,8%) e MSSA (43,2%), e mortalidade total de 47,0%, predominantemente entre pacientes com infecção por MRSA (70,8% vs. 29,2%,  $P=0.05$ ). (Dados do artigo de qualificação em anexo - Anexo IV)

As infecções hospitalares por HA-MRSA estão tradicionalmente associadas aos seguintes fatores predisponentes: pacientes idosos, presença de comorbidades e tempo de internação, entre os associados ao paciente; e, cirurgia, procedimentos invasivos, uso de antimicrobianos e internação em unidades críticas como fatores extrínsecos (CHAMBERS & DE LEO, 2009).

No total, foram avaliadas na nossa investigação 492 amostras de *S. aureus* e 42,0% mostraram resistência à metilicina, com a maioria (78,0%) comportando-se como multirresistente aos antibióticos, característica fenotípica do microrganismo de origem hospitalar. A presença de MRSA / MSSA observada em nosso estudo foi semelhante à relatada por Kuehnert e colaboradores (2006) na Europa e Huang *et al.* (2006) na China, respectivamente, 43,0% e 42,0% de infecções por MRSA entre aquelas por *S. aureus*. Entretanto, a participação de pacientes infectados internados em UTI foi pequena nesta avaliação (16,5%) frente à frequências mais altas observadas em unidades clínicas (36,0%) e cirúrgicas (25,7%), evidenciando sua endemidade no hospital; ao contrário

dos trabalhos referentes a hospitais do hemisfério norte onde as infecções por este fenótipo são mais evidentes em pacientes de unidades críticas (CHAMBERS & DE LEO, 2009).

A partir dos anos 90 emergiram as amostras de CA-MRSA, usualmente associadas com infecções cutâneas e de tecidos moles, sobressaindo o impetigo, e especialmente em crianças (YAMAMOTO *et al.*, 2010), mas também em infecções graves como pneumonias necrotizantes e infecções de corrente sanguínea (ROSSNEY *et al.*, 2007; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). O único caso de origem comunitária, com isolamento de CA-MRSA, detectado na população estudada em Uberlândia foi de uma criança de um ano de idade, atendida no ambulatório, correspondendo a um episódio de otite. As infecções por este microrganismo se desenvolvem usualmente em indivíduos sadios sem a existência de fatores de risco para aquisição de MRSA, como hospitalização prévia (CDC, 2004).

Há sugestões de que CA-MRSA evoluiu espontaneamente a partir de amostras de MSSA, pela aquisição do gene *mecA* independentemente em muitas áreas geográficas (ENRIGHT *et al.*, 2002; OTTER & FRENCH, 2010) e, ao contrário das amostras de HA-MRSA, usualmente restritas a pacientes hospitalizados e com fatores de risco predisponentes já referidos anteriormente, disseminou-se na comunidade (YAMAMOTO *et al.*, 2010; CHAMBERS & DE LEO, 2009). A expansão da linhagem comunitária foi relatada em diferentes regiões geográficas como Canadá, Ásia, América do Sul, Austrália e Europa, incluindo, neste último continente, países onde historicamente a prevalência de MRSA é baixa como: Noruega, Holanda, Dinamarca e Finlândia (CHAMBERS & DE LEO, 2009).

Recentemente o microrganismo comunitário (CA-MRSA) começou a substituir o HA-MRSA em hospitais nos EUA e Taiwan, onde sua prevalência é alta em IRAS

(Infecções relacionadas à assistência à saúde) (SEYBOLD *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; PATEL *et al.*, 2008; POPOVICH, WEINSTEIN e HOTA, 2008; WANG *et al.*, 2008). POPOVICH *et al.* (2008) relataram que a participação de amostras de CA-MRSA na etiologia de infecções de corrente sanguínea por MRSA aumentou de 24,0% para 49,0% em um hospital de Chicago, evidenciando a substituição das amostras hospitalares tradicionais de MRSA (FENG *et al.*, 2008).

Em nossa avaliação este estudo é o primeiro no país, centrado em população hospitalar, a abordar a epidemiologia de infecções por MRSA considerando amostras multirresistentes e não-multirresistentes por métodos clássicos e moleculares.

No Brasil, os primeiros relatos sobre a presença de CA-MRSA foram relativos a infecções comunitárias, usualmente de pele e tecido subcutâneo e um caso de artrite séptica, nos estados do Rio Grande do Sul (RIBEIRO *et al.* 2005, 2007) e Rio de Janeiro (SCHUENCK *et al.*, 2009). A seguir, outras publicações descreveram estas amostras recuperadas de infecções de corrente sanguínea (TRINDADE *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2007; SCHUENCK *et al.*, 2009), tecido mole (RIBEIRO *et al.*, 2007) e sítio cirúrgico (MIRANDA *et al.*, 2007; SCHUENCK *et al.*, 2009), em pacientes apresentando fatores de risco tradicionais. O presente estudo refere-se exclusivamente a amostras de natureza hospitalar, excetuando-se duas, de atendimento ambulatorial: uma criança com otite anteriormente referida e um paciente com infecção cutânea. No total, entre os 45 pacientes com amostras não multirresistentes de MRSA, observamos o predomínio de infecções de corrente sanguínea (43,2%), seguidas de infecções de sítio cirúrgico e pele e tecido mole (38,3%) e pneumonia (18,4%).

Enquanto as amostras hospitalares são multirresistentes, as de CA-MRSA apresentam resistência somente aos  $\beta$ -lactâmicos, disponibilizando várias opções

quando de decisões terapêuticas (POPOVICH *et al.*, 2007). Entretanto, vem-se observando a aquisição crescente de genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005; RAMDANI-BOUGUESSA *et al.*, 2006; DIEP *et al.*, 2008).

Alguns clones de CA-MRSA, como o Europeu (ST80-SCCmecIV), apresentam um perfil específico de resistência incluindo o ácido fusídico, tetraciclina, canamicina e resistência variável à ciprofloxacina (VANDENESCH *et al.*, 2003; TRISTAN *et al.*, 2007). Entre as amostras de não MR-MRSA isoladas em nossa investigação o espectro de resistência aos antimicrobianos incluiu predominantemente eritromicina (88,8%), clindamicina (62,3%), fluorquinolona (33,4%), cloranfenicol (17,7%) e sulfametoxazol-trimetoprim (S+T) (8,8%). Entre as oito amostras que apresentaram o SCCmecIV 37,5% apresentou um resistograma comum com resistência apenas à eritromicina.

A susceptibilidade a antimicrobianos como tetraciclina, S+T, gentamicina, fluorquinolonas e clindamicina é considerada como marcador fenotípico para a detecção laboratorial presuntiva de CA-MRSA (MILLAR *et al.*, 2007; POPOVICH *et al.*, 2007). Embora a susceptibilidade à ciprofloxacina seja recomendada como teste de triagem primário para esta identificação pelo “HPA *Staphylococcus* Reference Laboratory” a maioria, usualmente, comporta-se como susceptível também ao S+T, gentamicina e clindamicina (MILLAR *et al.*, 2007). Popovich *et al.* (2007) verificaram que a clindamicina ou as fluorquinolonas foram os antimicrobianos que melhor previram o genótipo de CA-MRSA. Os valores preditivos positivos para a identificação destas amostras foram 94,0% entre as amostras de MRSA e para clindamicina e fluorquinolona, quando a prevalência destes isolados foi 75,0%. Os nossos dados, relativos às oito amostras SCCmecIV das 26 genotipadas entre as amostras não MR-MRSA, evidenciaram para clindamicina e fluorquinolona as seguintes frequências de

sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo, respectivamente: 50,0%, 94,4%, 80,0%; 75,0%, 66,6%, 50,0%. Por outro lado, dados de dois estudos realizados no país (TRINDADE *et al.*, 2005 e SCHUENCK *et al.*, 2009) sugerem a utilização da susceptibilidade ao S+T como marcador fenotípico de CA-MRSA. Aproximadamente 90,0% das amostras não-multirresistentes, bem como 100,0% das oito com genótipo SCCmecIV recuperadas no HC-UFU foram susceptíveis a este antimicrobiano.

Adicionalmente à susceptibilidade a diversas classes de antimicrobianos que não os  $\beta$ -lactâmicos, esta linhagem caracteriza-se pela resistência heterogênea à meticilina/oxacilina (OKUMA *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2010), refletida pelos baixos valores de MIC para estas penicilinas, em torno de 32  $\mu\text{g/mL}$  (RIBEIRO *et al.*, 2005). Os nossos resultados obtidos pelo E-test mostraram a maioria das amostras (75,0%) com resistência entre 1-2  $\mu\text{g/mL}$  e apenas duas amostras, 455 e 321, com MICs de 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

A virulência deste microrganismo é atribuída, principalmente, à produção de leucocidina de Panton-Valentine, citocina codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (OTTER & FRENCH, 2010), além de hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ) bem como de outros fatores de virulência comuns às amostras de *S. aureus* como superantígenos e toxinas (OTTER & FRENCH, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2010). A produção de leucocidina está associada às amostras de CA-MRSA prevalentes em alguns países como Austrália, Alemanha e, sobretudo, EUA onde sua presença é uma das características do clone USA 300 (ST8-IV) (OTTER & FRENCH, 2010). Entretanto, é incomum em várias linhagens de CA-MRSA isoladas em outros países, de forma que sua produção não é um marcador universal para este genótipo (NIMMO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2010). A leucocidina Panton-Valentine é, provavelmente, um fator de virulência com participação direta em episódios de pneumonia necrotizante (LABANDEIRA *et*

*al.*, 2007) mas, sua contribuição na patogenia das infecções de pele, tecido mole e outras infecções estafilocócicas invasivas é controversa (ELLINGTON *et al.*, 2007).

Considera-se que as amostras que produzem PVL representem um problema grave de saúde pública devido à sua virulência aumentada, bem como o potencial de transmissão desta característica, que torna este microrganismo uma ameaça real se importado para o interior de hospitais (NASS *et al.*, 2005). No entanto, amostras que carregam estes genes não estão associadas de forma clara com síndromes clínicas mais graves (MESRATI *et al.*, 2010). Schuenck *et al.* (2009) relataram ausência de leucocidina em 85,0% de amostras não multirresistentes SCCmecIV pertencentes a clones distintos no Rio de Janeiro, recuperados na sua maioria de pacientes internados. Este genótipo não foi detectado em nenhuma das amostras incluídas na nossa investigação. Outro fator de virulência pesquisado em nosso estudo foi a produção de  $\alpha$ -hemolisina, esta sim, documentada nas oito amostras pesquisadas. Entretanto, a associação destas hemolisinas com síndromes clínicas específicas ainda não foi descrita.

Em nosso estudo, a taxa de mortalidade hospitalar total, no prazo de trinta dias pós o diagnóstico, foi de 43,2% e, significativa ( $P \leq 0,01$ ) entre os pacientes com infecção pelo microrganismo multirresistente e quando da comparação com os pacientes com infecção por amostras não-multirresistentes. Na análise multivariada a multirresistência foi um fator independente ( $P < 0,01$ ) para um pior prognóstico (óbito). Entre as oito amostras identificadas como SCCmecIV, incluindo um isolado de um episódio de otite de natureza comunitária, não foram observados óbitos, apesar da maioria (62,2%) estar associada à infecções graves, como pneumonias e infecções de corrente sanguínea. Há poucos relatos sugestivos de que a mortalidade por bacteremias de natureza hospitalar por CA-MRSA e CA-MSSA não são diferentes (WANG *et al.*, 2008) ao contrário do

observado com as infecções comunitárias quando, aquelas por CA-MRSA apresentam evolução menos favorável do que as por CA-MSSA (DAVIS *et al.*, 2007).

O uso intenso e indiscriminado de antimicrobianos, tanto na comunidade quanto em hospitais, é um problema de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento como no Brasil (NETTLEMAN, 1993; GOULD, 2009), justificando a situação, cada vez mais preocupante, de emergência e prevalência de microrganismos multirresistentes (GOLDMANN & HUSKINS, 1997). Em relação ao CA-MRSA, sugere-se que a presença do SCCmecIV seja uma vantagem para o microrganismo, com os níveis mais baixos de antimicrobianos utilizados na comunidade suficientes para sua disseminação sem maior custo biológico (LEVIN, 2001; DIEP *et al.*, 2008), em contraste com amostras SCCmecII e III, multirresistentes, endêmicas nos hospitais gerais, cujo maior número de genes impõe um custo biológico e seriam favorecidas pela força pressora resultante dos níveis elevados de antimicrobianos no ambiente hospitalar, mas que restringiriam sua disseminação na comunidade (ENDER *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; DIEP *et al.*, 2008). Entretanto, uma vez introduzido em hospitais pela admissão de doentes infectados ou portadores, as amostras de MRSA SCCmecIV, particularmente USA300, causam infecções nosocomiais, em pacientes com a presença de fatores predisponentes clássicos, como já referido anteriormente (MORAN *et al.*, 2006; POPOVICH *et al.*, 2008), e observado no nosso estudo. Contudo as infecções de pele e tecido mole, assim como a internação em unidades pediátricas, foram fatores de risco independentes para infecções por amostras não MR-MRSA, enquanto as recuperadas de corrente sanguínea, sítio cirúrgico e pneumonia sobressaíram entre as multirresistentes.

A combinação de técnicas moleculares, particularmente as tipagens por “multilocus sequence typing (MLST)”, além do “pulsed-field” e “spa typing”

(CHAMBERS & DE LEO, 2009), é usualmente utilizada na definição de tipos e clones de CA-MRSA (OTTER & FRENCH, 2010). Amostras idênticas de acordo com a análise pela técnica de MLST são consideradas como de um mesmo “sequence typing” (ST) e os STs que diferem em menos de três loci gênicos são agrupados em complexos clonais (CC) (OTTER & FRENCH, 2010). Assim como ocorreu com o MRSA multirresistente associado a instituições de saúde, clones bem sucedidos de CA-MRSA estão usualmente relacionados com regiões geográficas específicas por razões ainda não bem compreendidas, mas que, provavelmente, incluem fatores sócio-econômicos, práticas de prescrição de antimicrobianos e surtos comunitários e hospitalares (VANDENESCH *et al.*, 2003; TRISTAN *et al.*, 2007; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

Os primeiros relatos de casos de infecções por CA-MRSA foram causados pela linhagem USA400/ MW2 (ST1-IV, PVL+), relacionada com o clone WA-1, PVL-australiano e com MSSA476 prevalente no Reino Unido (CDC, 1999, OTTER & FRENCH, 2010). Atualmente, o clone USA300 (ST8-IV, PVL+) não só substituiu os antigos clones como o USA400, como também se tornou o agente mais freqüente de infecções hospitalares nos Estados Unidos e Canadá (SEYBOLD *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2008; POPOVICH, WEINSTEIN & HOTA, 2008), onde também tem crescido a participação do clone USA 100 (ST5) (JOHNSON *et al.*, 2001; KLEVENS *et al.*, 2007). USA 300 é também um patógeno nosocomial importante em Taiwan (HUANG *et al.*, 2007), ao contrário do que ocorre em outras regiões geográficas, incluindo a Europa onde as amostras de CA-MRSA são caracterizadas pela diversidade clonal (CHAMBERS & DE LEO, 2009; OTTER & FRENCH, 2010). O clone mais comum neste continente (Clone Europeu) é o ST80-IV, embora relatos da participação do USA300 estejam aumentando (OTTER & FRENCH, 2010). No Reino Unido os

principais clones circulantes relacionados com infecções comunitárias são ST1-IV, PVL- e ST30-IV, PVL+ (OTTER & FRENCH, 2010), também associados com surtos hospitalares (DAVID *et al.*, 2006; HPA, 2006). Adicionalmente, os clones ST59-IV, PVL+ e ST30-IV, PVL+ (Southwest Pacific Clone / OSPC) sobressaem em Taiwan e, este último, além do ST1, ST93, e ST29 são mais representativos na Oceania/Austrália (HUANG *et al.*, 2007; STAM-BOLINK *et al.*, 2007).

No Brasil, amostras de HA-MRSA pertencentes ao BEC (“Brazilian epidemic clone”, ST239-IIIa) se disseminaram entre hospitais gerais tornando-se endêmicas nos mesmos (SOARES *et al.*, 2001, FORTALEZA *et al.*, 2010), representando aproximadamente 80,0 a 97,0% das amostras de MRSA hospitalares clássicas (SADER *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2001). O primeiro relato de infecções causadas por CA-MRSA (RIBEIRO *et al.*, 2005) evidenciou a participação do clone OSPC (ST30-IV, PVL+) em três amostras associadas a infecções de pele (2) e artrite séptica (1), de natureza comunitária em pacientes atendidos ambulatorialmente em hospitais de Porto Alegre, RS. Posteriormente foi relatada a emergência da linhagem comunitária de *S. aureus* em hospitais de São Paulo (TRINDADE *et al.*, 2005), Recife e Rio de Janeiro (MIRANDA *et al.*, 2007; SCHUENCK *et al.*, 2009). A primeira publicação (TRINDADE *et al.*, 2005) refere-se a 13,0% de amostras de MRSA não-multirresistentes, SCCmecIV em isolados de sangue de neonatos internados em UTI, enquanto, Miranda e colaboradores (2007) incluíram amostras de pacientes adultos ou idosos em Recife apresentando comorbidades e outros fatores de risco observados tradicionalmente em infecções por HA-MRSA, e de isolados de profissionais de saúde de um hospital pediátrico colonizados por MRSA, verificando prevalência de 14,0% e 5,9%, respectivamente, de amostras do tipo SCCmecIV. Posteriormente Schuenck *et al.* (2009) analisaram 20 amostras com o mesmo genótipo SCCmecIV recuperadas de

pacientes internados e ambulatoriais no hospital universitário da UFRJ caracterizadas pela policlonalidade. Em nosso estudo, foram detectadas 45 (21,8%) amostras não-multirresistentes, das quais oito (17,7%) foram identificadas como SCC*mecIV* entre as 26 submetidas à tipagem molecular.

A análise epidemiológica molecular das amostras de CA-MRSA no país indicam maior prevalência do clone OSPC (69,2%) tanto naquelas provenientes do Rio de Janeiro quanto de Porto Alegre, em infecções de natureza comunitária, incluindo cinco pacientes sem fatores de risco e quatro com hospitalização prévia no último ano; além de quatro amostras caracterizadas como WA-1/USA400 (ST1-IV, PVL-) e uma como USA300 (ST8-V, PVL-), estes últimos, isolados de pacientes hospitalizados. Os nossos resultados, evidenciaram, entre as oito amostras do genótipo SCC*mecIV*, a maioria (87,5%), como do clone ST5 (1-4-1-4-12-1-10) pela técnica de MLST, com uma amostra apresentando resultado inconclusivo devido à presença de três alelos indeterminados. A prevalência hospitalar deste clone foi relatada anteriormente por Trindade *et al.* (2005) e, posteriormente por Miranda *et al.* (2007). Estudos realizados em outros países como Bélgica e França também relataram a presença de amostras de HA-MRSA abrigando o SCC*mecIV* (BERTRAND, THOUVEREZ & TALON, 2000; MANGENEY *et al.*, 2002; DENIS *et al.*, 2003), com aumento de 22,0% para 48,0% entre os anos de 1995 a 1998, em hospitais belgas.

O clone ST5-IV pertence ao complexo clonal 5 (CC5) e é referido como USA800 pelo perfil PFGE, representando amostras de MRSA de origem hospitalar (OTTER & FRENCH, 2009; ENRIGHT *et al.*, 2002). Na nossa investigação quando da avaliação do “DNA fingerprinting” pelo PFGE, a comparação com amostras “padrões” dos clones USA300 e USA800 não foi realizada, impossibilitando afirmar que se trata

do clone hospitalar clássico (Clone Pediátrico), embora a tipagem pelo MLST mostre similaridade.

O clone ST5 parece ter presença importante em hospitais brasileiros e seu sucesso no ambiente hospitalar parece estar relacionada à vantagem biológica de multiplicação mais rápida que amostras de HA-MRSA (LAURENT *et al.*, 2001) que pode contribuir para o aumento de sua prevalência.

## 6 – Conclusões

- Amostras não multirresistentes e do tipo *SCCmecIV* representaram apenas 21,8% e 3,8%, respectivamente, daquelas de MRSA isoladas de pacientes internados no HC-UFU, na sua maioria de infecções de corrente sanguínea;
- Verificou-se o predomínio de infecções de natureza hospitalar (98,0%) incluindo as causadas por amostras do genótipo *SCCmecIV* (87,5%), entre as quais apenas uma, referente a um caso de otite, foi caracterizada como CA-MRSA;
- Foram fatores de risco para aquisição de infecções por HA-MRSA: cirurgia, uso de cateter vascular periférico e sonda vesical bem como o uso de mais de dois procedimentos invasivos e internação em unidades críticas (UTI adultos), quando da análise univariada. A evolução para o óbito foi um fator independente relacionado à infecção por HA-MRSA quando comparado com aquela por amostras não multirresistentes de MRSA;
- Entre os antimicrobianos testados a susceptibilidade ao sulfazotrim foi o que mostrou maior sensibilidade, sugerindo sua utilização como marcador fenotípico na identificação presuntiva de amostras *SCCmecIV* e, adicionalmente as amostras não multirresistentes de MRSA apresentaram um MIC baixo para oxacilina;
- Entre as oito amostras *SCCmecIV* foi identificado um único clone / genótipo (PFGE), apresentando 5 subtipos (A1,A2, A3, A4 e A5), pertencente ao complexo clonal cinco (CC5) (MLST); e, sete destas amostras foram caracterizadas como do clone ST5, semelhante ao clone pediátrico (USA800), considerado predominantemente como associado a infecções relacionadas com instituições de assistência à saúde.

- Estas oito amostras foram negativas para produção de PVL e positivas para hemolisina.

Concluindo, embora nossos dados de vigilância sejam limitados, os resultados mostraram a prevalência do tipo ST5-IV de MRSA de natureza hospitalar inferior em relação às relatadas nos Estados Unidos para o clone comunitário ST8-IV, PVL+ (USA300), bem como para o clone hospitalar ST5 (USA800) na Bélgica e na França, mas, com melhor prognóstico para o paciente quando da comparação com infecções por amostras multirresistentes clássicas de HA-MRSA. Entretanto, a vigilância epidemiológica destas linhagens (ST5-IV, PVL-) tanto na comunidade quanto nos hospitais depende de muitos fatores e deve ser motivo de preocupação dos serviços de saúde pública.

## 7 – Referências Bibliográficas

BERTRAND, X.; THOUVEREZ, M.; TALON, D. Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in eastern France. **J Hosp Infect.** v.4, p.280-287, 2000.

BOYCE, J.M.; JACKSON, M.M.; PUGLIESE, G.; BATT, M.D.; FLEMING, D.; GAINES, J.S.; HARTSTEIN, A.I.; KAUFFAN, C.A.; SIMMONS, M.; WEINSTEIN, R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a briefing for acute care hospitals and nursing facilities. **Infection Control and Hospital Epidemiology.** v.15, p.105-115, 1994.

BOYCE, J.M. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. **Journal of Hospital Infection.** v.48 Suppl A, p.S9-S14, 2001.

BOYLE-VAVRA, S.; ERESHEFSKY, B.; WANG, C.C.; DAUM, R.S. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV. **J Clin Microbiol.** v.43, p.4719–30, 2005.

CARVALHO, R.H.; GONTIJO FILHO, P.P. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian university hospital. **Braz J Microbiol.** v.39, p. 623-630, 2008.

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases.** v.7, n. 2, p.178-182, 2001.

CHAMBERS, H.F.; DE LEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat Rev Microbiol.** v.7, p.629-41, 2009.

CDC. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. **JAMA**. v.282, p.1123-1125, 1999.

CDC. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Pacific Islanders — Hawaii, 2001–2003. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.** v.53, p.767–770, 2004.

CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational Supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COOKSON, B. D.; PHILLIPS, I. Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother.** v.21 Suppl C, p.57-65, 1988.

CROSSLEY, K.B.; THURN, J.R. Control measures for MRSA – can the cost be reduced? In: Cafferkey, M.T., ed. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. New York: Marcel Dekken, 1992: 187-196.

DAVID, M.D.; KEARNS, A.M.; GOSSAIN, S.; GANNER, M.; HOLMES, A. Community-associated *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. **J Hosp Infect.** v.64, p.244-5, 2006.

DAVIS, S.L.; PERRI, M.B.; DONABEDIAN, S.M.; MANIERSKI, C.; SINGH, A.; VAGER, D.; HAQUE, N.Z.; SPEIRS, K.; MUDER, R.R.; ROBINSON-DUNN, B.; HAYDEN, M.K.; ZERVOS, M.J. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **J Clin Microbiol.** v.45, p.1705-1711, 2007.

DA SILVA COIMBRA, M.V.; SILVA-CARVALHO, M.C.; WISPLINGHOFF, H.; HALL, G.O.; TALLENT, S.; WALLACE, S.; EDMOND, M.B.; FIGUEIREDO, A.M.;

WENZEL, R.P. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. **J Hosp Infect.** v.53, p.103-10, 2003.

DENIS, O.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; NONHOFF, C.; STRUELENS, M.J. Emergence and spread of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals. **Microb Drug Resist.** v.9, p.61-71, 2003.

DEURENBERG, R.H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** v. 13, p. 222-35, 2007.

DEURENBERG RH, STOBBERINGH EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol.** v.8, p.747-63, 2008.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M.; SENTRY Participants Group. Survey of infections due to **Staphylococcus** species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin Infect Dis.** v. 32 Suppl 2, p.S114-32, 2001.

DIEP, B.A.; STONE, G.G.; BASUINO, L.; GRABER, C.J.; MILLER, A.; DES ETAGES, S.A.; JONES, A.; PALAZZOLO-BALANCE, A.M.; PERDREAU-REMYINGTON, F.; SENSABAUGH, G.F.; DELEO, F.R.; CHAMBERS, H.F. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis.** v.197, p.1523-30, 2008.

DIEP, B.A.; GILL, S.R.; CHANG, R.F.; PHAN, T.H.; CHEN, J.H.; DAVIDSON, M.G.; LIN, F.; LIN, J.; CARLETON, H.A.; MONGODIN, E.F.; SENSABAUGH, G.F.; PERDREAU-REMYINGTON, F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic

clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. v.367, p.731–9, 2006.

DUFOUR, P.; GILLET, Y.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; FLORET, D.; ETIENNE, J.; RICHET, H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. **Clin Infect Dis**. v.35, p.819-24, 2002.

DURUPT, F.; MAYOR, L.; BES, M.; REVERDY, M-E.; VANDENESCH, F.; THOMAS, L.; ETIENNE, J. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. **Br J Dermatol**. v.157, p.1161-7, 2007.

EGGIMANN, P.; PITTET, D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. **Clin Microbiol Infect**. v.8, p.295-309, 2002.

ELLINGTON, M.J.; HOPE, R.; GANNER, M.; GANNER, M.; EAST, C.; BRICK, G.; KEARNS, A.M. Is Pantone-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? **J. Antimicrob. Chemother**. v.60, p.402–405, 2007.

ENDER, M.; McCALLUM, N.; ADHIKARI, R.; BERGER-BACHI, B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.48, p.2295–7, 2004.

ENRIGHT, M.C.; DAY, N.P.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S.J.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol**. V.38, p.1008-15, 2000.

ENRIGHT MC, ROBINSON DA, RANDLE G, FEIL EJ, GRUNDMANN H, SPRATT BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS**. v. 99, p. 7687-7692, 2002.

EYKYN, S.J.; GRANSDEN, W.R.; PHILLIPS, I. The causative organisms of septicaemia and their epidemiology. **J Antimicrob Chemother**. v.25(suppl C): p. 41-58, 1990.

FENG, Y.; CHEN, C.J.; SU, L.H.; HU, S.; YU, J.; CHIU, C.H. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. **FEMS Microbiol Rev**. v.32, p.23-37, 2008.

FRENCH, G.L. Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. In MAYHALL, C.G. Hospital epidemiology and infection control. Cap. 91, p. 1613-36, 2004.

From the Centers for Disease Control and Prevention. MRSA in Healthcare Settings. 2006. [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_MRSA\\_spotlight\\_2006.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_MRSA_spotlight_2006.html).

GALES, A.C.; ANDRADE, S.S.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Activity of mupirocin and 14 additional antibiotics against staphylococci isolated from Latin American hospitals: report from SENTRY antimicrobial surveillance program. **J Chemother**. v. 16, p.323-328, 2004.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, A.J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Braz J Infect Dis**. v.13(2),p.90-98, 2009.

GARNER, J.S.; JARVIS, W.R.; EMORI, T.G.; HORAN, T.C.; HUGHES, J.M. CDC definitions for nosocomial infections. **American Journal of Infection Control**. v.16, p.128-140, 1998.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J.C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIEMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETIENNE, J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**. v.359, p.753-9, 2002.

GOLDMANN, D.A.; HUSKINS, W.C. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. **Clin Infect Dis**. v.24(Supp 1), p.139-45, 1997.

GOULD, I.M. Controversies in infection: infection control or antibiotic stewardship to control healthcare-acquired infection? **J Hosp Infect**. v.73, p. 386-391, 2009.

HANSEN, A.M.; SOLLID, J.U.E. SCCmec in staphylococci: genes on the move. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v.46, p.8–20, 2006.

HARTSTEIN, A.I.; SEBASTIAN, T.J.; STRAUSBAUGH, L.J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: Mayhall CG, ed. Hosp Epidemiol Infect Control. Lippincott Williams & Wilkins. p.471-484, 2004.

HEALTH PROTECTION AGENCY. Hospital-associated transmission of Panton-Valetine Leukocidin (PVL) positive community-associated MRSA in the West Midlands. **Commun Dis Report**. v.16, p.2-3, 2006.

HORAN, T.; ANDRU, S.M.; DUDECK, M.A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control**. v.36, p.309-32, 2008.

HUANG, H.; FLYNN, N.M.; KING, J.H.; MONCHAUD, C.; MORITA, M.; COHEN, S.H. Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in Sacramento, California. **J Clin Microbiol**. v.44, p. 2423-2427, 2006.

HUANG, Y.H.; TSENG, S.P.; HU, J.M.; TSAI, J.C.; HSUEH, P.R.; TENG, L.J. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. **Clin Microbiol Infect.** v.13, p. 717-724, 2007.

HUNTER, J.D. Ventilator associated pneumonia. **Postgrad Med J.** v.82, p.172–178, 2006.

HURLEY, J.C. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. **Med J Aust.** v.176(4), p.188-189, 2002.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4961–7.

JOHNSON, A.P.; AUCKEN, H.M.; CAVENDISH, S.; GANNER, M.; WALE, M.C.; WARNER, M.; LIVERMORE, D.M.; COOKSON, B.D. UK EARSS participants. Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). **J. Antimicrob. Chemother.** v.48, p.143–144, 2001.

KAUFFMAN, C.A.; BRADLEY, S.F.; TERPENNING, M.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term care facilities. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.11(11), p.600-3, 1990.

KLEVENS, R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S. et al. Invasive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA.** v.298, p. 1763-71, 2007.

KUEHNERT, M.J.; HILL, H.A.; KUPRONIS, B.A.; TOKARS, J.I.; SOLOMON, S.L.; JERNIGAN, D.B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. **Emerg Infect Dis.** v. 12, p. 1472, 2006.

LABANDEIRA-REY, M.; COUZON, F.; BOISSET, S.; BROWN, E.L.; BES, M.; BENITO, Y.; BARBU, E.M.; VAZQUEZ, V.; HÖÖK, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BOWDEN, M.G. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. **Science**. v.315, p.1130–3, 2007.

SAFDAR, N.; BRADLEY, E.A. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. **Am J Med**. v.121, p.310-5, 2008.

LARSEN, A.R.; GOERING, R.; STEGGER, M.; LINDSAY, J.A.; GOULD, K.A.; HINDS, J.; SØRUM, M.; WESTH, H.; BOYE, K.; SKOV, R. Two distinct clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the same USA300 pulsedfield gel electrophoresis profile: a potential pitfall for identification of USA300 community-associated MRSA. **J Clin Microbiol**. v.47, p.3765–8, 2009.

LAURENT, F.; LELIÈVRE, H.; CORNU, M.; VANDENESCH, F.; CARRET, G.; ETIENNE, J.; FLANDROIS J.P. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. **J Antimicrobial Chemother**. v.47, p.277-283, 2001.

LEE, S.M.; ENDER, M.; ADHIKARI, R.; SMITH, J.M.; BERGER-BACHI, B.; COOK, G.M. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. **Antimicrob Agents Chemother**. v.51, p.1497–9, 2007.

LEVIN BR. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. **Clin Infect Dis**. v.33(Suppl 3), p.S161-9, 2001.

MANGENEY, N.; DROLLEE, K.; CLOITRE, V.; BORDES, M.; FAUBERT, E.; DUPEYRON, C. Comparative pulsed-field gel electrophoresis typing of gentamicin-resistant and susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in

France between 1991 and 1998. Changes in antibiotic susceptibility. **J Hosp Infect.** v.4, p. 262-268, 2002.

MANGRAM, A.J.; HORAN, T.C.; PEARSON, M.L.; SILVER, L.C.; JARVIS, W.R. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.20, p.250-280, 1999.

MAYHALL, C.G. Hospital epidemiology and infection control. Lippincott Williams & Williams: 3<sup>a</sup> Ed. Philadelphia – USA. 2004. 2060p.

MESRATI, I.; SAÏDANI, M.; ENNIGROU, S.; ZOUARI, B.; BEN REDJEB, S. Clinical isolates of Pantone-Valentine leucocidin- and gamma-haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. **J Hosp Infect.** v.75, p.265-8, 2010.

MILLAR, B.C.; LOUGHREY, A.; ELBORN, J.S.; MOORE, J.E. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **J Hosp Infect.** v.67, p.109-113, 2007.

MILLER, L.G.; DIEP, B.A. Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clin Infect Dis.** v.46, p.752-60, 2008.

MIRANDA, O.P.; SILVA-CARVALHO, M.C.; RIBEIRO, A.; PORTELA, F.; CORDEIRO, R.P.; CAETANO, N.; VIDAL, C.F.L.; FIGUEIREDO, A.M.S. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. **Clin Microbiol Infect Dis.** v.13, p.1165-1172, 2007.

MORAN, G.J.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R.J.; FOSHEIM, G.E.; MCDOUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; TALAN, D.A. Methicillin-resistant *S. aureus*

infections among patients in the emergency department. **N Engl J Med.** v.355, p.666–674, 2006.

MOREIRA, M.R.; CARDOSO, R.L.; ALMEIDA, A.B.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk factors and evolution of ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus* sensitive and resistant to oxacillin in patients at the intensive care unit of a Brazilian university hospital. **Braz J Infect Dis.** v. 12, p. 499-503, 2008.

NAIMI TS, LEDELL KH, COMO-SABETTI K, BORCHARDT SM, BOXRUD DJ, ETIENNE J, JOHNSON, S.K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R.N.; LYNFIELD, R. Comparison of community- and health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA.** v.290, p.2976–84, 2003.

NAAS, T.; FORTINEAU, N.; SPICQ, C.; ROBERT, J.; JARLIER, V.; NORDMANN; P. Three-year survey of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. **J Hosp Infect.** v.61, p.321-9, 2005.

NETTLEMAN, M.D. Global aspects of infection control. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.14, p.646-8, 1993.

NIMMO, G.R.; COOMBS, G.W.; PEARSON, J.C.; O'BRIEN, F.G.; CHRISTIANSEN, K.J.; TURNIDGE, J.D.; GOSBELL, I.B.; COLLIGNON, P.; MCLAWS, M.L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. **Med J Aust.** v.184, p. 381-88, 2006.

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.; HIRAMATSU, K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J Clin Microbiol.** v.40, p.4289-94, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A.; LENCASTRE H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect Dis.** v.2(5), p.180-9, 2002.

OTTER, J.A.; FRENCH, G.L. Molecular Epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect Dis.** v.10, p.227-39, 2010.

PARK, D.R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. **Resp Care.** v.50, p.742-763, 2005.

PADOVEZE, M.C.; ASSIS, D.B.; FREIRE, M.P.; MADALOSSO, G.; FERREIRA, S.A.; VALENTE, M.G.; FORTALEZA, C.M.C.B. Surveillance program for healthcare associated infections in the state of São Paulo, Brazil. Implementation and the first three years' results. **J Hosp Infect.** v.76(4); p. 311-315, 2010.

PATEL, M.; WAITES, K.B.; HOESLEY, C.J.; STAMM, A.M.; CANUPP, K.C.; MOSER, S.A. Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. **J Hosp Infect.** v.68, p. 208-213. 2008.

PFALLER, M.A. **Typing methods for epidemiologic investigation.** In: BALLOWS, A.; HAUSLLER, W.J.; HERRMANN, K.L.; ISEMBERG, H.D.; SHADOMY, H.J., Manual of Clinical Microbiology. 5ed. Washington, cap.23, p.171-182.1993.

POPOVIC, K.; HOTA, B.; RICE, T.; AROUTCHEVA, A.; WEINSTEIN, R.A. Phenotypic prediction rule for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** v.45, p.2293-2295, 2007.

POPOVICH, K.; WEINSTEIN, R.A.; HOTA, B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? **Clin Infect Dis.** v.46, p.787-94, 2008.

RAMDANI-BOUGUESSA, N.; BES, MEUGNIER, H. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the

Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, p.1083-85, 2006.

REDZINIAK, D.E.; DIDUCH, D.R.; TURMAN, K.; HART, J.; GRINDSTAFF, T.L.; MACKNIGHT, J.M.; MISTRY, D.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Athlete. **Int J Sports Med.** v.30, p.557–62, 2009.

REINERT, C. Genes de virulência *agr*-dependentes em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina SCCmec tipo IV isoladas no Brasil. 2006. 108p. Tese, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RIBAS, R.M.; MELO, G.B.; GONTIJO FILHO, P.P. Isolados clínicos de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos com susceptibilidade reduzida à vancomicina em pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *Newslab*, v.55, p.90-98, 2003.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BERQUÓ, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.S.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J Clin Microbiol.** v.43, p.1985-8, 2005

RIBEIRO, A.; CORONADO, A.Z.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P.F.; LEITE, C.C.F.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. 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. *Diag Microbiol Infect Dis.* v.59, p.339-345. 2007.

ROBINSON, D.A.; ENRIGHT, M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.47(12), p.3926-34, 2003.

ROBINSON, D.A.; ENRIGHT, M.C. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** v.10(2), p.92-7, 2004.

ROSSNEY, A.S.; SHORE, A.C.; MORGAN, P.M.; FITZGIBBON, M.M.; O'CONNELL, B.O.; COLEMAN, D.C. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Pantone-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. **J Clin Microbiol.** v.45, p.2554-2563, 2007.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, E.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. and the SENTRY Participants group (América Latina). SENTRY antimicrobial program report: Latin American and Brazilian results from 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v. 8, p.25-79, 2004.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infections in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v.4, n.2, p.135-143, 2000.

SCHUENCK, R.P.; NOUÉR, S.A.; WINTER, C.O.; CAVALCANTE, F.S.; SCOTTI, T.D.; FERREIRA, A.L.P.; MARVAL, M.G.; DOS SANTOS, K.R.N. Polyclonal presence of non- multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbial and Infect Dis.** v.64, p.434-441, 2009.

STAM-BOLINK, E. M.; MITHOE, D.; BAAS, W. H.; ARENDS, J. P.; MOLLER, A. V. Spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80 strain in the

community of the northern Netherlands. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.26, p.723–727, 2007.

SEYBOLD, U.; KOURBATOVA, E.V.; JOHNSON, J.G.; HALVOSA, S.J.; WANG, Y.F.; KING, M.D.; RAY, S.M.; BLUMBERG, H.M. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. **Clin Infect Dis.** v.42, p.647-56, 2006.

SHUKLA, S.K.; STEMPER, M.E.; RAMASWAMY, S.V.; CONRADT, J.M. REICH, R.; GRAVISS, E.A.; REED, K.D. Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. **J Clin Microbiol.** v.42(8), p.3752-7, 2004.

SKOV, R.L.; JENSEN, K.S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. **J Hosp Infect.** v.73, p.364-70, 2009.

SOARES, M.J.S.; TEIXEIRA, L.A.; NUNES, M.R.C.M.; SILVA, M.C.C.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M.S. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian Epidemic Clone. **J Med Microbiol.** v.50, p.1-11, 2001.

SOUSA, M.A.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S.; ÁVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S.T.; BRANDILEONE, M.C.C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, M.E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANO-SANTOS, F.; HEITMANN, I.; LENCASTRE, H. Three year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **J Clin Microbiol.** v.39, p.197-205, 2001.

TAKANO, T.; HIGUCHI, W.; YAMAMOTO, T. Superior in vitro activity of carbapenems over anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and some

related antimicrobial agents for community-acquired MRSA but not for hospital-acquired MRSA. **J Infect Chemother.** v.15, p.54–7, 2009.

TENOVER, F.; ARBEIT, R.; GOERING, R.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.18, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect Dis.** v.7(2), p.327-32. 2001.

TENOVER, F.C.; McDOUGAL, L.K.; GOERING, R.V.; KILLGORE, G.; PROJAN, S.J.; PATEL, J.B.; DUNMAN, P.M. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. **J Clin Microbiol.** v.44, p.108-18, 2006.

TONG, S.Y.; McDONALD, M.I.; HOLT, D.C.; CURRIE, B.J.; Global implications of the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in indigenous populations. **Clin Infect Dis.** v.46, p.1871-1878, 2008.

TRINDADE, P.A.; PACHECO, R.L.; COSTA, S.F.; ROSSI, F.; BARONE, A.A.; MAMIZUKA, E.M.; LEVIN, A.S. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** v.43, p.3435-7, 2005.

TRISTAN, A.; BES, M.; MEUGNIER, H.; LINA G.; BOZDOGAN, B.; COURVALIN, P.; REVERDY, M.E.; ENRIGHT, M.C.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin – positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. **Emerg Infect Dis.** v.13, p.594-600, 2007.

VAN DER FLIER, M.; VAN DIJK, N.B.; FUIT, A.C.; FLEER, A.; WOLFS, T.F.; VAN GESTEL, J.P. Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Pantone-Valentine-leukocidin. **Ned Tijdschr Geneeskd.** v.147, p.1076-9, 2003.

VAN TRIJP, M.M.J.; HENDRIKS, W.D.; PARLELIET, G.A.; GOMMANS, M.; OTT, A. Succesful control of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization an infection in a large teaching hospital in the Netherlands. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.28, p. 970-5, 2007.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E.; ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerg Infect Dis.** v.9, p.978-84, 2003.

WANG, J.L.; CHEN, S.Y.; WANG, J.T.; WU, G.H.M.; CHIANG, W.C.; HSUEH, P.R.; CHEN, Y.C.; CHANG, S.C. Comparison of both clinical features and mortality risk associated with bacteremia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus*. **CID.** v.46, p.799-806, 2008.

WUNDERINK, R.G.; RELLO, J.; CAMMARATA, S.K.; CROOS-DABRERA, R.V.; KOLLEF, M.H. Linezolid vs vancomycin: analysis of two double-blind studies of

patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. **Chest.** v.124(5), p.1789-1797, 2003.

YALCIN, A.N. Socioeconomic burden of nosocomial infections. **Indian Journal of Medical Sciences.** v.57, n.10, p.450-456, 2003.

YAMAMOTO, T.; NISHIYAMA, A.; TAKANO, T.; YABE, S.; HIGUSHI, W.; RAZVINA, O.; SHI, D. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. **J Infect Chemother.** v. 16, p.225-54, 2010.

YOON, H. J.; CHOI, J.Y.; KIM, C.O.; SONG, Y.G. A comparison of clinical features and mortality among methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains of *Staphylococcus aureus* endocarditis. **Yonsei Med J.** v.46(4), p.496-502, 2005.

ZHANG, K.; MCCLURE, J.A.; ELSAYED, S.; TAN, J.; CONLY, J.M. Coexistence of Panton-Valentine leukocidin-positive and –negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. **Infect Dis.** v.197, p.195-204, 2008.

## 8 - ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131



### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 218/06

**Registro CEP: 014/06**

**Projeto Pesquisa:** *"Incidência de SCCmec TIPO IV DE staphylococcus aureus em infecções de pele e tecidos moles, corrente sanguínea e pneumônicas, comunitárias e hospitalares em um hospital universitário de Minas Gerais."*

**Pesquisador Responsável:** Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação:** Projeto aprovado.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

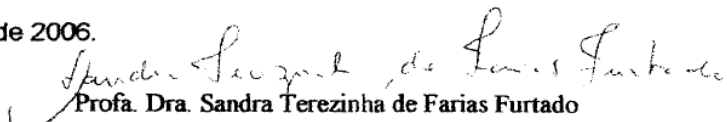
**Data para entrega do Relatório Parcial: dezembro/2006**

**Data para entrega do Relatório Parcial: dezembro/2007**

**Data para entrega do Relatório Parcial: dezembro/2008**

**Data para entrega do Relatório Final: março/2009**

Uberlândia, 09 de agosto de 2006.

  
Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

*(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)*

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

## 9 - ANEXO II

### Termo de Consentimento livre e esclarecido

Caro paciente,

Este é um termo de consentimento para sua participação voluntária em uma pesquisa a ser realizada dentro do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. A nossa pesquisa tem como objetivo a busca de uma bactéria (*Staphylococcus aureus*) que causa infecções nos hospitais e em pessoas da comunidade (aquelas que não estão internadas). O benefício do nosso estudo se baseia no fato de que o diagnóstico precoce de colonização de pacientes por esta bactéria, tanto nos internados em UTIs quanto em pessoas com infecções simples de pele (como furúnculos e abscessos) pode prevenir infecções graves em pacientes debilitados, bem como a disseminação deste microrganismo, evitando que outras pessoas adquiram a mesma doença.

Para que possamos fazer o diagnóstico precoce é necessário coletar uma amostra de secreção pulmonar a partir de pacientes com suspeita de pneumonia. Mas como esta coleta é realizada? A secreção pulmonar é removida diariamente pela equipe de fisioterapia como um procedimento de rotina, em todos os pacientes com prótese ventilatória. A limpeza do respirador, que ajudam o paciente a respirar, é indispensável. Como o nosso estudo é direcionado aos pacientes com pneumonia e internados na UTI, durante a limpeza diária do tubo, nosso material é obtido não alterando a rotina do paciente e nem causando a ele nenhum desconforto adicional, uma vez que este procedimento já é parte do tratamento. A qualquer momento, caso seja o seu desejo, você poderá ser excluído da pesquisa entrando em contato com os pesquisadores responsáveis por telefone ou endereço listados abaixo.

Os resultados obtidos serão utilizados na pesquisa e os nomes dos pacientes não serão divulgados.

Eu \_\_\_\_\_ ou responsável  
( \_\_\_\_\_ ) aceito participar voluntariamente desta pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável

**Quaisquer dúvidas, em relação aos procedimentos realizados ou aos resultados, poderão ser esclarecidas nos seguintes locais:**

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho (Pesquisador responsável pela pesquisa) e Profa. Karinne Spirandelli Carvalho (Aluna do curso de pós-graduação): Av. Pará Bloco 4C (Laboratório de Microbiologia) - Universidade Federal de Uberlândia - Campus Umuarama – Telefone: (34) 3218 2236

Comitê de Ética em Pesquisa: Telefones: (34) 3239 4531 / 32394131

## 10 - ANEXO III

### Ficha Clínica

**Coleta No.:** \_\_\_\_\_ **Prontuário:** \_\_\_\_\_ **data de internação:** \_\_/\_\_/\_\_ **data da coleta:** \_\_/\_\_/\_\_

**Idade na coleta:** \_\_\_\_ **anos** **Data de nascimento:** \_\_/\_\_/\_\_ **RG:** \_\_\_\_\_ **Unidade de Internação:** \_\_\_\_\_ **Gênero:** \_\_\_\_ 0 (M) / \_\_\_\_ 1 (F) **Doença de Base:** \_\_\_\_\_ **CID:** \_\_\_\_\_ **Diagnóstico principal (motivo da internação):** \_\_\_\_\_

**Trauma:** \_\_\_\_ 0 (Sim) / \_\_\_\_ 1 (Não)

**Sítio de infecção:** \_\_\_\_ 0 (Pele e tecidos moles) / \_\_\_\_ 1 (ISC) / \_\_\_\_ 2 (Sangue) / \_\_\_\_ 3 (PAV)

**Data do diagnóstico:** \_\_/\_\_/\_\_ **Tipo de infecção:** \_\_\_\_ 0 (Comunitária) / \_\_\_\_ 1 (Hospitalar)

**Internação Atual (Unidade de internação):** \_\_\_\_ 0 UTI / \_\_\_\_ 1 C I / \_\_\_\_ 2 C II / \_\_\_\_ 3 C III / \_\_\_\_ 4 C IV / \_\_\_\_ 5 MI / \_\_\_\_ 6 PS / \_\_\_\_ 7 GO / \_\_\_\_ 8 Queimados / \_\_\_\_ 9 Psiquiatria / \_\_\_\_ 01 Cl. M / \_\_\_\_ 02 Ambulatório / \_\_\_\_ 03 Outros

**Leucócitos:** \_\_\_\_\_

No momento da internação ou 2 semanas antes da data da hemocultura positiva

**Cateter venoso Central:** S ( ) Não ( ) **Data Início** \_\_/\_\_/\_\_ **Data Fim** \_\_/\_\_/\_\_

(antes da data da hemocultura positiva/dirante toda internação)

**Procedimentos invasivos:** \_\_\_\_ 0 (CVC) / \_\_\_\_ 1 (TET) / \_\_\_\_ 2 (SV) / \_\_\_\_ 3 (CVP) / \_\_\_\_ 4 nenhum

**Antibiótico:** \_\_\_\_ 0 (Sim) / \_\_\_\_ 1 (Não) **Quais?** \_\_\_\_\_ **Via:** \_\_\_\_\_ **Data de início:** \_\_/\_\_/\_\_

**Procedimento Cirurgico:** \_\_\_\_ 0 (Sim) / \_\_\_\_ 1 (Não) **Tipo:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_/\_\_/\_\_

**Internação Prévia: S ( ) Não ( )** **Data** \_\_/\_\_/\_\_ (período máximo de 1 ano antes da internação atual)

## 11 - ANEXO IV

### **METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* BLOODSTREAM INFECTION: RISK FACTORS AND CLINICAL OUTCOME IN NON- INTENSIVE CARE UNITS (MRSA bloodstream infection)**

Authors:

Karinne Spirandelli Carvalho – Uberlândia Federal University

Natália Vaz da Trindade – Uberlândia Federal University

Paulo P. Gontijo Filho – Uberlândia Federal University

Corresponding author:

Karinne Spirandelli Carvalho Naves

Address

Rua Geraldo de Moraes, nº 1115 apto 402

Bairro: Cazeca

CEP: 38400-020

Uberlândia – Minas Gerais; Brasil

Telephone number: 55 (34) 32182236; 55 (34) 32182333

E-mail: [kspirandelli@yahoo.com.br](mailto:kspirandelli@yahoo.com.br)

# METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* BLOODSTREAM INFECTION: RISK FACTORS AND CLINICAL OUTCOME IN NON-INTENSIVE CARE UNITS

## Summary

**Objectives:** The aim of this study was to identify risk factors for methicillin-resistance in *S. aureus* BSI and the predictive factors for death.

**Methods:** A retrospective cohort of Fifty one patients presenting bacteraemia due to *S. aureus* between September 2006 and September 2008 was analysed. *S. aureus* samples were obtained from hemocultures performed by hospital microbiology laboratory. Methicillin-resistance was determined by growth on oxacillin screen agar and antimicrobial susceptibility by means of the disk diffusion method.

**Results:** We found similar numbers of MRSA (56.8%) and MSSA (43.2%) infections and overall hospital mortality ratio was 47%, predominantly in MRSA group (70.8% vs. 29.2%) ( $P=0.05$ ). Age ( $P=0.02$ ) and presence of central venous catheter ( $P=0.02$ ) were significantly increased in MRSA patients. Regarding the outcome the use of two or more antimicrobial agents ( $P=0.03$ ) and length of hospital stay prior to bacteraemia superior to seven days ( $P=0.006$ ) were associated to death. The use of more than two antimicrobial agents remained associated to death and high odds ratio value were observed to cardiopathy as comorbidity and length of hospital stay prior to bacteraemia.

**Conclusions:** Despite several risk factors were associated to MRSA and MSSA infection and mortality, the use of two or more antimicrobial agents was the unique independent variable for death.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; MRSA; Bacteraemia

## Introduction

A broad variety of infections, ranging from minor infections of the skin to severe infections as bloodstream infections (BSI) can be caused by *S. aureus*. Today methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is an endemic nosocomial pathogen, but has recently begun to appear in the community<sup>1</sup>. Some previous studies of patients with MRSA bloodstream infection (BSI) have reported higher mortality rates, increased morbidity and longer hospital length of stay than those with MSSA BSI<sup>2,3</sup>. In the UK, MRSA infection is cited with increasing frequency as causing or contributing to death<sup>4,5</sup>. Risk factors for methicillin-resistance in these infections have been extensively described but vary among institutions<sup>6,7</sup>.

Methicillin-resistance among *S. aureus* remain as an important problem in Latin America hospitals<sup>8</sup>, but rates vary significantly from hospital to hospital. In Brazil, the Antimicrobial Surveillance Program (SENTRY)<sup>9</sup> described a prevalence of MRSA bacteraemia of 30.9% in hospitalized patients between 1997 and 2000, but in large brazilian teaching hospitals up to 73.0% of clinically significant *S. aureus* bacteraemias were caused by methicillin-resistant strains. Ribas, Freitas e Gontijo Filho (2009)<sup>10</sup> reported 49.5% of bloodstream infection in Hospital de Clínicas of Uberlândia's Federal University due to *S. aureus* and recently Carvalho and Gontijo Filho (2008)<sup>11</sup> described 63.7% of *S. aureus* BSI due to MRSA in adult critical care unit.

The objectives of this study were to identify institution-specific risk factors for methicillin-resistance in *S. aureus* BSI, to determine the predictive factors for death and assess the impact of methicillin-resistance on mortality in patients in non-intensive care units of a Brazilian University Hospital.

## Materials and Methods

The study was conducted in a 500-bed teaching hospital which provides tertiary care for Uberlândia and surroundings. The investigation was designed as a retrospective cohort of patients presenting bacteraemia due to *S. aureus*. Clinical and epidemiological data were collected from the hospital patient records. The present study was approved by Ethics Committee of Federal University of Uberlândia (UFU) (014/06).

BSIs were classified as primary when they were unrelated to another focus of infection. BSIs were considered to be secondary when they were clinically related to infection in another site than the vascular system<sup>12</sup>. Previous antimicrobial therapy was defined as the use of any antibiotic within 30 days prior to bacteraemia<sup>13</sup>. Antimicrobial therapy was considered to be adequate if the drug used within the first 48 h after blood culture collection had in vitro activity against the isolated *S. aureus* strain<sup>13</sup>. Bacteraemia-associated mortality was characterized by the patient's death during the bacteremic episode and/or 30 days after hospitalization period without any other explanation<sup>14</sup>.

Hemocultures were performed inoculating 5-10 mL of blood into a flask of the automatic commercial system Bactec/ Alert<sup>®</sup> (Vitek System). Positive cultures were further sub-cultured in Mueller-Hinton Agar (Isofar LTDA, Brazil) supplemented with 5% of human blood and incubated for 24-48 hours at 35 ± 2°C in the hospital microbiology laboratory. Methicillin-resistance was determined by growth on oxacillin screen agar and antimicrobial susceptibility by means of the disk diffusion method with disks containing antimicrobial agents.

Univariate analysis was used to compare variables for the outcome groups of interest. Continuous variables were compared using Student's *t* test

for normally distributed variables. The  $\chi^2$  statistic or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. Multivariate analysis was performed using multiple logistic regression with stepwise approach for entering new terms into the BioEstat5.0 model with 0.2 as the limit for their acceptance or removal. All *P* value lower than 0.2 were considered significant.

## Results

Between September 2007 and September 2008, 134 *S. aureus* BSI were identified. Methicillin-resistance rate was 59,7% (80/134). Unfortunately among these 83 were excluded from the study because of incomplete or missing data. A total of 51 episodes in patients were then reviewed. Ten patients presented multiple episodes of MRSA BSI and two presented multiple episodes of MSSA BSI. Thirty one infections occurred in male patients and twenty occurred in female patients (Table 1).

Table 1 shows clinical and demographic characteristics of patients with MRSA and MSSA BSI. MRSA BSI occurred in older patients, after a longer time following admission when compared to MSSA BSI. All MRSA BSI were classified as nosocomial. The use of more than two antimicrobial agents, comorbidity and length of hospital stay prior to bacteraemia longer than seven days were more frequent in MRSA group. Presence of intravascular device was significantly higher in MRSA than MSSA group. The sources of *S. aureus* BSI are also listed in Table 1 and in both, MRSA and MSSA primary BSI were the most common sources than secondary ones and 22 (75.9%) of whom with MRSA episodes associated with central venous catheter.

The overall mortality rate was 47%. Univariate analysis for potential prognostic death factors associated with *S. aureus* bacteraemia is presented in

Table 2. The presence of MRSA ( $P=0.057$ ), clinical status, represented by patient's unit ( $P=0.046$ ), and length of hospital stay prior to bacteraemia higher than seven days ( $P=0.006$ ) were significantly associated with death. No difference was found regarding sex, age, severity of underlying disease, nosocomial origin of the infection or presence of intravascular device among the patients who died compared with the patients who survived.

In multivariate analysis (Table 3) use of more than two antibiotics was independently associated with mortality by *S. aureus* (OR=8.65; 95%IC = 1.92 to 39.07;  $P=0.05$ ), but ORs observed for long duration of hospital stay (OR=4.7) and cardiopathy (OR=5.85) were both high in death patients group.

## Discussion

Hospital acquired bloodstream infections caused by *S. aureus*, mainly those due to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), are associated with significant mortality and morbidity<sup>15</sup> and add considerable costs to hospital care<sup>16</sup>. In Brazil *S. aureus* was the most common cause of bloodstream infection (20.2%) and resistance to methicillin was observed in 31.0% of *S. aureus* isolates in the Brazilian hospital participating of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme<sup>9</sup>. However, MRSA rates may vary greatly among hospitals (55.9 – 73.0%)<sup>8, 13</sup>. In our hospital bacteraemia rates caused by MRSA were both high in both critical (63.7%) and non-critical units (62.5%)<sup>11</sup>. In our study we observed a similar rate (56.8%) of BSI due to MRSA in clinical, burned and oncology wards and almost all BSIs (96.0%) had nosocomial origin.

The emergence of MRSA is largely due to dissemination of clonal strains between patients favored for poor infection control politics and antimicrobial

pressure <sup>17</sup> but this correlation has been difficult to establish due to the high number of variables involved <sup>18</sup>. Risk factors for methicillin resistance reported in literature also vary among institutions and patients. The major independent risk factors includes: advanced age <sup>19,20</sup>, residence in a nursing home <sup>7, 21</sup>, long duration of hospitalization <sup>4</sup>, prior antibiotic exposure <sup>6, 22</sup>, insulin-requiring diabetes <sup>23</sup>, intravascular devices <sup>3, 24</sup>, presence of decubitus ulcers or pneumonia as source of BSI <sup>6, 15, 24</sup>, inadequacy of antimicrobial therapy and severity of clinical status <sup>13</sup>.

In the present study, based on univariate analysis, age and presence of CVC were risk factor for MRSA bacteraemia as also reported previously <sup>10,13</sup>. Most of MRSA bacteraemia (72.4%) was classified as primary and, CVC was probably the foci of infection as discussed by Das, O'Connell and Lambert (2007)<sup>24</sup>. A high proportion of these infections was detected in clinical ward (34.5%) when most studies report higher MRSA infections in critical care units<sup>24, 25</sup>.

Other analyzed variables as length of hospital stay prior to bacteraemia (OR=3.19), cardiopathy as comorbidity (OR=2.85), and more than two antimicrobial drugs usage (OR=2.74), despite had not significance, presented high OR values when compared MRSA and MSSA infections. Several studies also have demonstrated that longer hospitalization before the onset of bacteraemia <sup>25</sup> and antimicrobials use in greater frequency <sup>10</sup> were risk factor for MRSA infection. None of these factors: age, central vascular catheter presence or even the use of more than two antimicrobial drugs, cardiopathy or longer hospital stay prior to bacteraemia, were independently prognostic factors for MRSA infection in our study.

Comparisons of mortality between patients with MRSA and MSSA have been contradictory in the literature <sup>15</sup>. Several studies including a meta-analysis one have demonstrated an increase in mortality among patients with MRSA bacteraemia versus MSSA bacteraemia <sup>3, 4, 26, 27</sup>. In this study a higher crude mortality of 58.6% vs 24.1% (OR=3.036; P=0.05) was observed in the MRSA group than MSSA one, respectively, but significant just in univariate analysis and with rates much higher than those reported in UK and US hospitals <sup>15, 27</sup>.

Traditional risk factors for mortality includes older age <sup>28, 15, 10</sup>, inadequate treatment <sup>13, 29</sup> and severity of comorbidity <sup>25</sup>. Despite in our study these variables were not significant we attribute an association between them and mortality due to the high OR values of 2.80, 2.04 and 3.85, respectively. Intensive care unit admission before bacteraemia is also a predictor for MRSA-BSI mortality <sup>15, 24</sup>. However according to our data most of deaths due to Staphylococcal BSI occurred in the clinical ward (45%; P=0.046) with only 4% of patients carried out in the ICU.

Length of hospitalization is a measure of morbidity <sup>15</sup> as well as invasive device use as CVC <sup>30</sup>. On univariate analysis death was associated with an increase in length of hospital stay for more than seven days (P<0.05) and the use of more than two antimicrobial drugs (P= 0.034) but only the former was independently significant (OR=8.65; P= 0.005) in multiple regression analysis. In multivariable analysis for the length of hospital stay prior to bacteraemia superior to seven days (OR=4.7) and cardiopathy as comorbidity (OR=5.8) we observed high OR values. These findings coincide with previous reports demonstrating that longer of hospital stay before bacteraemia <sup>25</sup> and comorbidities as cardiopathy <sup>31</sup> were influencing factors for mortality.

Nevertheless, in our study patients with bacteraemia besides longer hospitalization before diagnostic and high frequency of CVC use (62.7%) were usually carried out in non-critical units due to lack of sufficient beds in the ICU and 33.3% of them received inadequate empirical antimicrobial therapy that resulted in higher rate (41.6%) of hospital mortality. Eighty percent of the patients who died using an inadequate treatment were from MRSA BSI infections group.

Our study has certain limitations that must be acknowledged; it was retrospective and performed at the single hospital, therefore our results are not necessarily applicable to other settings. Additionally, the sample size of the study limits its power to detect statistically significant difference. We also did not use the Apache II or other score to assess severity of illness prognostic indicator on the hospital mortality.

In conclusion, even so most of cases were found in patients admitted to non-critical care units they resulted in high hospital mortality. We found several risk factors associated to MRSA and MSSA bacteraemia and high mortality level of *S. aureus* bacteraemia. However the use of two or more antimicrobial agents was the unique independent variable for death. This can be partially justified by high frequency of inadequate empirical therapy observed in our study. In spite of limitations, mainly the small number of patients, the study suggests that the hospital antimicrobial policies followed in the hospital should be reviewed.

#### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

1. Grundmann H, Aires de Souza M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *S. aureus* as public-health threat. *Lancet* 2006; 368: 874-885.
2. Kopp BJ, Nix DE, Armstrong EP. Clinical and economic analysis of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* infections. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1377-2382.
3. Cosgrove S, Sakoulas G, Perencevich R, Schwaber MJ, Karchmer AW, Careli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 53-59.
4. Whitby M, McLaws M-L, Berry G. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta analysis. *Med J Aust* 2001; 175: 264-267.
5. Thompson DS, Workman R, Strutt M. Contribution of acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia to overall mortality in a general intensive care unit. *J Hosp Infect* 2008; 70: 223-227.
6. Lodise Jr TP, McKinnon PS, Rybak M. Prediction model to identify patients with *S. aureus* bacteremia at risk for methicillin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 655-661.
7. McHugh CG, Riley Lee W. Risk factors and costs associated with methicillin-resistant *S. aureus* blood-stream infections. *Infect control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 425-430.
8. Sader H, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. and the SENTRY participants. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin

America and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis 2004; 8: 25-79.

9. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari C. Antimicrobial susceptibility of Gram-Positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). The Braz J Infect Dis 2009; 13: 90-98.

10. Ribas RM, Freitas C, Gontijo Filho PP. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care hospital: Risk factors, overall mortality and antimicrobial resistance. Int J of Medicine and Medical Sciences 2009; 1: 412-417.

11. Carvalho RH, Gontijo-Filho PP. Epidemiologically relevant antimicrobial resistant phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian university hospital. Braz J Microbiol 2008; 39: 623-630.

12. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control 1988; 16:128-140.

13. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CMT, Primo MGB. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. J Hosp Infect 2006; 63: 330-336.

14. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. Chest 2000; 118: 146-155.

15. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. Infect Control Hosp Epidemiol 2005; 26: 166-174.

16. Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). J Hosp Infect 2007; 67: 109-113.
17. Da Silva Coimbra MV, Silva-Carvalho MC, Wisplinghoff H, Hall GO, Tallent S, Wallace S, Edmond MB, Figueiredo AM, Wenzel RP. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. J Hosp Infect. 2003; 53: 103-10.
18. Tenover FC, Moellering JR RC. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretative criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2007; 44: 1208-15.
19. Cordova SP, Heath CH, McGeachie DB, Keil AD, Beers MY, Riley TV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Western Australia teaching hospitals, 1997-1999: risk factors, outcomes and implications for management. J Hosp Infect 2004; 56:22-28.
20. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. Clin Infect Dis 2004; 39: 776-782.
21. Jernigan J, Pullen A, Flowers L, Bell M, Jarvis W. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24: 409-414.
22. Pujol M, Pena C, Pallares R, Ayats J, Ariza J, Gudiol F. Risk factors for nosocomial bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 96-102.

23. Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel V, Forsberg RC, Davignon DR, Smith DG. A prospective study of risk factors for diabetic foot ulcer. *Diabetes Care* 1999; 22: 1036-1042.
24. Das I, O'Connell N, Lambert P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. *J Hosp Infect* 2007; 65: 117-123.
25. Wang FD, Chen YY, Chen TL, Liu CY. Risk factors and mortality in patients with nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Control* 2008;36:118-22.
26. Conterno L de, Wey SB, Castelo A. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: comparison of two periods and a predictive model of mortality. *Braz J Infect Dis* 2002; 6: 288-297.
27. Melzer M, Eykyn SJ, Gransden WR, Chinn S. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteraemia. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1453-1460.
28. Nickerson EK, Wuthiekanun V, Wongsuvan G, Limmathurosakul D, Srisamang P, Mahavanakul W, Thaipadungpanit J, Shah KR, Arayawichanont A, Amornchai P, Thanwisai A, Day NP, Peacock SJ. Factors Predicting and Reducing Mortality in Patients with Invasive *Staphylococcus aureus* Disease in a Developing Country. *Plos One* 2009; 4: 1-8.
29. Libert M, Elkholti M, Massaut J, Karmali R, Mascart G, Cherifi S. Risk factors for methicillin resistance and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in a Belgian university hospital. *J Hosp Infect* 2008; 68: 17-24.

30. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. Lancet 2003; 361:2068-77.
31. Soriano A, Martinez JA, Mensa J, Marco F, Almela M, Moreno-Martinez A, Sanchez F, Munoz I, Jimenez de Anta MT, Soriano E. Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Clin Infect Dis 2000; 30: 368-373.

## Tables

Table 1. Clinical and demographic characteristics of patients with MRSA and

|                                                 | MSSA BSI                 |                          |                               |              |
|-------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------|
|                                                 | MRSA<br>N= 29<br>(56.8%) | MSSA<br>N= 22<br>(43.2%) | Odds Ratio (CI <sup>1</sup> ) | P<br>(≤0.05) |
| Mortality                                       | 17 (58.6)                | 7 (24.1)                 | 3.036 (0.949 – 9.719)         | 0.057        |
| Age (years), median<br>(range)                  | 56.13 (0-89)             | 39.6 (0-80)              |                               | 0.021        |
| Sex (female / male)                             | 11/18                    | 9/13                     | 0.882 (0.284 – 2.743)         | 0.829        |
| LOS before BSI (days),<br>median (range)        | 46,4<br>(0-300)          | 13,7<br>(0-74)           |                               | 0.074        |
| Origin onset                                    |                          |                          |                               |              |
| Community-acquired                              | 0                        | 2 (9.0)                  | 0.139 (0.006 – 3.051)         | 0.181        |
| Nosocomial                                      | 29 (100.0)               | 20 (91.0)                |                               |              |
| Prior hospitalization                           | 14 (48.3)                | 12 (54.5)                | 0.777 (0.255 – 2.364)         | 0.657        |
| Antimicrobial therapy                           |                          |                          |                               |              |
| - No                                            | 2                        | 4                        | 0.333 (0.055 – 2.016)         | 0.389        |
| - Yes                                           | 27                       | 18                       |                               |              |
| - ≥ 2                                           | 19                       | 9                        | 2.744 (0.874 – 8.618)         | 0.080        |
| Comorbidity                                     | 27 (93.1)                | 18 (81.8)                | 3.000 (0.496 – 18.14)         | 0.382        |
| - Diabetes                                      | 4 (14.8)                 | 3 (16.6)                 | 1.013 (0.202 – 5.079)         | 1.000        |
| - Cardiopathy                                   | 9 (31.0)                 | 3 (16.6)                 | 2.850 (0.668 – 12.15)         | 0.192        |
| - Pulmonary disease                             | 3 (11.1)                 | 2 (11.1)                 | 1.154 (0.175 – 7.579)         | 1.000        |
| - Nephropathy                                   | 2 (7.4)                  | 1 (5.5)                  | 1.556 (0.131 – 18.35)         | 1.000        |
| - Malignancy                                    | 3 (11.1)                 | 5 (27.7)                 | 0.392 (0.082 – 1.861)         | 0.267        |
| - Others                                        | 6 (22.2)                 | 4 (22.2)                 | 1.174 (0.287 – 4.798)         | 1.000        |
| Surgery                                         | 16 (55.2)                | 14 (63.6)                | 0.703 (0.225 – 2.191)         | 0.543        |
| Presence of central<br>venous catheter          | 22 (75.9)                | 10 (45.5)                | 3.771 (1.141 – 12.46)         | 0.026        |
| Unit                                            |                          |                          |                               |              |
| ITU                                             | 1(3.5)                   | 1 (4.5)                  | 0.750 (0.044 – 12.70)         | 1.000        |
| Surgical                                        | 5 (17.3)                 | 4 (18.2)                 | 0.720 (0.158 – 3.269)         | 0.712        |
| Clinical                                        | 10 (34.5)                | 5 (22.7)                 | 1.789 (0.508 – 6.293)         | 0.361        |
| Pediatrics                                      | 1 (13.5)                 | 2 (9.0)                  | 0.357 (0.030 – 4.217)         | 0.571        |
| Others                                          | 12 (41.4)                | 10 (45.4)                | 0.847 (0.276 – 2.592)         | 0.771        |
| Source                                          |                          |                          |                               |              |
| Primary                                         | 21 (72.4)                | 19 (86.4)                | 0.357 (0.030 – 4.217)         | 0.571        |
| Secondary                                       | 8 (27.6)                 | 3 (13.6)                 | 2.413 (0.557 – 10.44)         | 0.311        |
| Length of hospital stay<br>prior to bacteraemia |                          |                          |                               |              |
| > 7 days                                        | 23 (79.3)                | 12 (54.5)                | 3.194 (0.933 – 10.93)         | 0.059        |
| < 7 days                                        | 6 (20.7)                 | 10 (45.5)                | 0.313 (0.091 – 0.575)         | 0.059        |
| Initial antimicrobial<br>therapy                | 10 (34.5)                | 7 (31.8)                 | 1.128 (0.346 – 3.670)         | 0.841        |
| Inadequate                                      | 19 (65.5)                | 15 (68.2)                | 0.886 (0.272 – 2.885)         | 0.845        |
| Adequate                                        |                          |                          |                               |              |

<sup>1</sup>CI: Confidence Interval

Table 2. Potential prognostic death factors associated with *S. aureus*

| bacteraemia           |                               | Outcome N=51                     | Odds Ratio (CI)       | P<br>(≤0.05) |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------|
|                       |                               |                                  |                       |              |
|                       | Death<br>N (%)<br>N= 24(47.0) | Survival<br>N (%)<br>N= 27(53.0) |                       |              |
| Sex (female / male)   | (11/13)                       | (9/18)                           | 1.692 (0.544 – 5.259) | 0.361        |
| Age                   |                               |                                  |                       |              |
| ≥ 60 years            | 13 (54.2)                     | 8 (29.6)                         | 2.807 (0.88 – 8.88)   | 0.075        |
| ≤ 60 years            | 11 (45.8)                     | 19 (70.4)                        |                       |              |
| Origin onset          |                               |                                  |                       |              |
| Community-acquired    | 0 (0)                         | 2 (7.4)                          | 0.208 (0.009 – 4.56)  | 0.491        |
| Nosocomial            | 24 (100)                      | 25 (92.6)                        |                       |              |
| Susceptibility to     |                               |                                  |                       |              |
| meticillin            | 17 (70.8)                     | 12 (44.4)                        | 3.035 (0.949 – 9.709) | 0.057        |
| Resistant             | 7 (29.2)                      | 15 (55.6)                        | 0.3294 (0.1030 -      | 0.109        |
| Sensitive             |                               |                                  | 1.0533)               |              |
| Antimicrobial therapy |                               |                                  |                       |              |
| - No                  | 2                             | 3                                |                       |              |
| - Yes                 | 22                            | 24                               |                       |              |
| - ≥ 2                 | 16 (72.7)                     | 10 (41.6)                        | 2.744 (0.874 – 8.618) | 0.034        |
| Initial antimicrobial |                               |                                  |                       |              |
| therapy               | 10 (41.6)                     | 7 (25.9)                         | 2.041 (0.625 – 6.663) | 0.234        |
| Inadequate            | 14 (58.4)                     | 20 (74.1)                        | 0.490 (0.150 – 1.600) | 0.234        |
| Adequate              |                               |                                  |                       |              |
| Comorbidity           | 22 (91.6)                     | 20 (74.1)                        | 3.85 (0.714 – 20.75)  | 0.146        |
| - Diabetes            | 4 (18.2)                      | 3 (15.0)                         | 1.60 (0.319 – 8.01)   | 0.693        |

|                                                 |           |           |                       |       |
|-------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------|-------|
| - Cardiopathy                                   | 5 (22.7)  | 4 (20.0)  | 1.51 (0.355 – 6.443)  | 0.718 |
| - Pulmonary disease                             | 3 (13.7)  | 0         | 8.95 (0.438 – 183.0)  | 0.097 |
| - Nefropathy                                    | 0         | 4 (20.0)  | 0.106 (0.005 – 2.092) | 0.112 |
| - Malignancy                                    | 5 (22.7)  | 3 (15.0)  | 2.105 (0.445 – 9.950) | 0.450 |
| - Others                                        | 5 (22.7)  | 6 (30.0)  | 0.921 (0.241 – 3.516) | 1.000 |
| Surgery                                         | 15 (62.5) | 15 (55.5) | 0.777 (0.229 – 2.635) | 0.686 |
| Presence of central<br>venous catheter          | 16 (66.6) | 16 (59.3) | 1.375 (0.437 – 4.319) | 0.585 |
| Unit                                            |           |           |                       |       |
| ITU                                             | 1 (4.0)   | 1 (3.7)   | 1.130 (0.066 – 19.13) | 1.000 |
| Surgical                                        | 5 (20.8)  | 4 (14.8)  | 1.513 (0.355 – 6.443) | 0.718 |
| Clinical                                        | 11 (45.8) | 5 (18.5)  | 3.457 (0.988 – 12.09) | 0.046 |
| Pediatrics                                      | 2 (8.6)   | 4 (14.8)  | 0.522 (0.086 – 3.149) | 0.671 |
| Others                                          | 5 (20.8)  | 13 (48.2) | 0.283 (0.081 – 0.980) | 0.041 |
| Length of hospital stay<br>prior to bacteraemia |           |           |                       |       |
| > 7 days                                        | 21 (87.5) | 14 (51.8) | 6.500 (1.561 – 27.06) | 0.006 |
| < 7 days                                        | 3 (12.5)  | 13 (48.2) | 0.153 (0.036 – 0.640) | 0.007 |

Table 3. Multivariate analysis for mortality by *Staphylococcus aureus*  
bacteraemia

| Variable                                                    | Odds ratio | 95%CI         | <i>P</i> |
|-------------------------------------------------------------|------------|---------------|----------|
| More than two antimicrobial agents                          | 8.655      | 1.92 to 39.07 | 0.005    |
| MRSA Infection                                              | 0.500      | 0.11 to 2.24  | 0.361    |
| Cardiopathy                                                 | 5.851      | 0.91 to 37.51 | 0.062    |
| Presence of intravascular device                            | 0.888      | 0.20 to 3.98  | 0.876    |
| Length of hospital stay prior to<br>bacteraemia<br>> 7 days | 4.716      | 0.79 to 27.99 | 0.087    |

CI, confidence interval; OR, odds ratio; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.