

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JOÃO PAULO BASTOS DE MORAES

PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE À METICILINA (MRSA) EM PACIENTES HIV POSITIVOS ATENDIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS NO PERÍODO DE 2010 A 2015

Rio de Janeiro

2017

JOÃO PAULO BASTOS DE MORAES

PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE À METICILINA (MRSA) EM PACIENTES HIV POSITIVOS ATENDIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS NO PERÍODO DE 2010 A 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI – Fiocruz para obtenção do grau de Mestre.

Orientadores: Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso dos Santos
Dr. Fábio Aguiar Alves

Rio de Janeiro

2017

de Moraes, João Paulo Bastos .

Prevalência e incidência de colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (mrsa) em pacientes hiv positivos atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas no período de 2010 a 2015 / João Paulo Bastos de Moraes. - Rio de Janeiro, 2017.

LXXXVI, 86f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2017.

Orientadora: Valdiléa Gonçalves Veloso dos Santos.

Co-orientadora: Fábio Aguiar Alves.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. HIV/AIDS . 2. MRSA . 3. Colonização. 4. Prevalência. 5. Incidência . I.
Título.

JOÃO PAULO BASTOS DE MORAES

PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE À METICILINA (MRSA) EM PACIENTES HIV POSITIVOS ATENDIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS NO PERÍODO DE 2010 A 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI – Fiocruz para obtenção do grau de Mestre a Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso dos Santos
Dr. Fábio Aguiar Alves

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Dra. Rosely Maria Zancopé – INI/Fiocruz (Presidente)

Dr. Estevão Portela Nunes - INI/Fiocruz

Dr. Robson de Souza Leão – UERJ

Aos meus pais pelo incentivo ao estudo e exemplo de conduta ética e moral.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Bacteriologia e Biensaios do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI – Fiocruz pelo excelente trabalho consolidado ao longo de todos esses anos, pela oportunidade de aprendizado e disponibilização dos recursos para realização deste estudo.

Ao Laboratório de Epidemiologia e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense – LEMB/UFF pelo acesso e confiança.

À Coordenação e Secretaria de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas-INI-Fiocruz pela solicitude e compreensão.

À Dra. Valdiléa Gonçalves Veloso dos Santos pelo apoio e disponibilização dos recursos para realização e consolidação deste estudo.

À Maria Cristina da Silva Lourenço por ceder as amostras de MRSA utilizadas neste estudo, pela confiança e experiência profissional compartilhada.

Ao Prof. Dr. Fábio Aguiar Alves por ter sido mais que um orientador, um amigo e, trabalhar nessas condições, sempre rende bons frutos.

À Maria de Fátima Nogueira de Freitas Alves pela expertise, ajuda e ensinamentos.

À Daniela de Assis Gonzalez, minha companheira de vida, pelo carinho, cuidado e paciência, estando ao meu lado durante todos esses anos.

À minha família pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis.

(Bertolt Brecht)

RESUMO

Introdução: A colonização nasal por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de infecção por este micro-organismo. Portadores do vírus HIV apresentam risco elevado de infecção por MRSA, apresentando maiores taxas de morbimortalidade que a população geral. **Objetivo:** Avaliar a prevalência e a incidência de colonização nasal por MRSA em pacientes HIV positivos internados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI – Fiocruz. **Material e métodos:** Estudo de coorte retrospectivo em único centro com amostras de MRSA (172) obtidas por coleta de “swab” nasal e sítios de infecção. Foram incluídos 764 pacientes entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos por análise dos prontuários eletrônicos. Foram realizadas caracterização fenotípica e genotípica por PCR para os genes *Sa442* e *mecA*, além dos genes da PVL. A caracterização clonal foi realizada pelas técnicas de *Spa-typing* e MLST. As variáveis categóricas foram analisadas pelos testes Qui-quadrado de Pearson e Wilcoxon. **Resultados:** A prevalência global de colonização nasal por MRSA foi de 12,2% (IC 95%: 9.8 – 14.5) e a prevalência global de infecção foi de 3,5% (IC 95%: 2,2 – 4.8), sendo que a prevalência de infecção entre os colonizados foi de 18,3% (IC 95%: 10,3 – 26,3). Internação prévia nos últimos 12 meses (OR = 5; IQR 1.5 - 17.8; p = 0.005) e hepatite B (p=0,01) são fatores de risco para colonização, a qual aumenta em 65,5 vezes a probabilidade de morte (OR = 65,5; IC95%: 29,6 – 166,6). Processos infecciosos aumentam em 35,5 vezes a chance de ir a óbito (OR=35,5; IC95%: 15,3 – 85,5). Os genes *Sa442* e *mecA* foram encontrados em 100% das amostras. Os clones identificados foram ST239, ST30, ST5 e ST1. A positividade para os genes da PVL foi maior entre ST30 (89%). **Conclusão:** A prevalência de colonização na admissão foi de 5,8 % (IC 95%: 4,1 – 7,4) com 6,6 % (IC 95%: 4,8 – 8,3) de incidência durante a internação. A incidência de infecção foi de 1,3% (IC 95%: 0,7 – 1,9). Internação prévia nos últimos 12 meses (OR = 5; IQR 1.5 - 17.8; p = 0.005), hepatite B (p=0,01) e insuficiência renal crônica (p=0,05), são fatores de risco para colonização. Processos infecciosos aumentam em 35,5 vezes a chance de ir a óbito (OR=35,5; IC95%: 15,3 – 85,5). Foi confirmada a circulação dos clones ST30, ST239 e ST5 no ambiente hospitalar. Os resultados da CIM para vancomicina estão dentro dos valores de sensibilidade.

Palavras chave: HIV/AIDS; MRSA; Colonização; Prevalência; Incidência.

ABSTRACT

Introduction: Nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the main risk factor for the development of infection by this microorganism. HIV virus carriers are at high risk for MRSA infection, presenting higher morbidity and mortality rates than the general population. **Objective:** To evaluate the prevalence and incidence of nasal colonization by MRSA in HIV positive patients hospitalized at the National Institute of Infectology Evandro Chagas - INI - Fiocruz. **Material and methods:** Single-center retrospective cohort study with MRSA samples (172) obtained by nasal swab collection and infection sites. A total of 764 patients were included between January 2010 and December 2015. Clinical and epidemiological data were obtained by electronic records analysis. Phenotypic and genotypic characterization were performed by PCR for the *Sa442* and *mecA* genes, in addition to the PVL genes. The clonal characterization was performed by *Spa-typing* and MLST techniques. Categorical variables were analyzed using the Pearson's chi-square and Wilcoxon tests. **Results:** The overall prevalence of nasal colonization by MRSA was 12.2% (CI95%: 9.8 - 14.5) and the overall prevalence of infection was 3.5% (CI95%: 2.2 - 4.8), being that the prevalence of infection among the colonized was 18.3% (CI 95%: 10.3-26.3). Previous hospitalization in the last 12 months (OR = 5; IQR 1.5 - 17.8; p = 0.005) and hepatitis B (p = 0.01) are risk factors for colonization, which increases the probability of death by 65.5 times (OR = 65.5, CI95%: 29.6 - 166.6). Infectious processes increase the chance of death by 35.5 times (OR = 35.5, CI95%: 15.3 - 85.5). The *Sa442* and *mecA* genes were found in 100% of the samples. The identified clones were ST239, ST30, ST5 and ST1. The positivity for the PVL genes was higher among ST30 (89%). **Conclusion:** The prevalence of colonization on admission was 5.8% (CI95%: 4.1 - 7.4) and 6.6% (CI95%: 4.8 - 8.3) of incidence during hospitalization. The incidence of infection was 1.3% (CI95%: 0.7 - 1.9). Previous hospitalization in the last 12 months (OR = 5, IQR 1.5 - 17.8, p = 0.005), hepatitis B (p = 0.01) and chronic renal failure (p = 0.05) are risk factors for colonization. Infectious processes increase the chance of death by 35.5 (OR = 35.5, CI95%: 15.3 - 85.5). The circulation of ST30, ST239 and ST5 clones in the hospital environment was confirmed. The MIC results for vancomycin are within the sensitivity values.

Keywords: HIV / AIDS; MRSA; Colonization; Prevalence; Incidence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores para análise do gene <i>Sa442</i>	41
Tabela 2: Iniciadores para análise do gene <i>mecA</i>	43
Tabela 3: Iniciadores para análise dos genes que codificam a PVL.....	45
Tabela 4: Iniciadores para análise do <i>Spa Typing</i>	46
Tabela 5: iniciadores para análise do Multilocus Sequence Typing-MLST.....	48
Tabela 6: Total de pacientes colonizados e/ou infectados por MRS internados no INI-Fiocruz entre 2010 e 2015 e N/Amostras.....	55
Tabela 7: Pacientes colonizados e infectados. Correlação entre as datas de internação, colonização, processo infeccioso e o tempo de permanência no hospital.....	57
Tabela 8: Pacientes que apresentaram somente infecção por MRSA. Correlação entre as datas da internação, processo infeccioso e tempo de permanência no hospital.....	58
Tabela 9: Pacientes colonizados e/ou infectados por MRSA que foram a óbito no período do estudo.....	59
Tabela 10: Análise das principais comorbidades como fator de risco para colonização.....	60
Tabela 11: Fenótipo de resistência aos antimicrobianos e perfil clonal das amostras identificadas em sítios de infecção e hemocultura e perfil clonal.....	66
Tabela 12: Resultado dos testes moleculares para os genes <i>Sa442</i> , <i>mecA</i> , <i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i>	63
Tabela 13: Resultado dos sequenciamentos obtidos pela técnica <i>spa-typing</i> e MLST.....	65
Tabela 14: Perfil clonal das amostras nasais identificados de pacientes com um único tipo clonal.....	65
Tabela 15: Perfil clonal dos MRSA identificados em pacientes colonizados e infectados por um único clone e espécime clínico.....	67
Tabela 16: Perfil clonal dos MRSA identificados em pacientes apenas com processo infeccioso causado por um único clone e espécime clínico.....	68
Tabela 17: Perfil clonal dos MRSA isolados de pacientes colonizados e/ou infectados por mais de um clone, N/amostras, N/pacientes e espécime clínico.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação da CIM observando a turvação.....	39
Figura 2: Avaliação da CIM observando a formação de cor.....	40
Figura 3: Amplificação do gene espécie específico Sa442 (108 pb).....	43
Figura 4: Amplificação do gene <i>mecA</i> (162 pb).....	44
Figura 5: Amplificação dos genes da PVL (<i>LukS</i> e <i>LukF</i> – 463 pb).....	46
Figura 6: Amplificação do gene <i>spa</i> (350-556 pb).....	47
Figura 7: Amplificação do gene <i>yqil</i> (516 pb).....	49
Figura 8: Prevalência global de colonização nasal por MRSA entre os pacientes HIV positivos internados no INI-Fiocruz no período entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015.....	55
Figura 9: Prevalência de colonização associada à comunidade ($\leq 48h$ após a internação).....	56
Figura 10: Incidência de colonização associada aos cuidados com a saúde ($>48h$ após a internação).....	56
Figura 11: Análise da contagem de CD4 como fator de risco para colonização.....	60
Figura 12: Análise quantificação da carga viral ($\log_{10} CV$) como fator de risco para colonização.....	61
Figura 13: Concentração inibitória mínima para a vancomicina pelo método da microdiluição em caldo e valores obtidos.....	63
Figura 14: Percentual dos perfis clonais das amostras de colonização comunitária por paciente.....	66
Figura 15: Percentual dos perfis clonais das amostras de colonização hospitalar por paciente.....	66
Figura 16: Infecções causadas pelos clones de MRSA ST239 X ST30 e espécimes clínicos.....	68
Figura 17: Infecções causadas pelos demais clones de MRSA e espécimes clínicos.....	69
Figura 18: Perfil clonal dos MRSA identificados de pacientes colonizados e/ou infectados que foram a óbito e N/amostras.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirada (do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome*)

AMP - adenosina-monofosfato

arcC - gene que codifica a enzima carbamato quinase

aroE - gene que codifica a enzima shikimato desidrogenase

AS - Ágar Sangue

AT - Aspirado traqueal

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain heart infusion*

BP - Biópsia de pele

BR - Branco da PCR

CA-MRSA - *Community-associated MRSA*

CC - Complexo clonal

CCIH - Comissões de Controle de Infecção Hospitalar

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CLED - *Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CN - Controle negativo da PCR

CP - Controle positivo da PCR

cART- *Combination antiretroviral therapy*

dNTP - Deoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA - *Ethylenediamine tetracetic acid*

glpF - gene que codifica a enzima glicerol quinase

gmK - gene que codifica a enzima guanilato quinase

HA-MRSA - *Healthcare-associated MRSA*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

h-VISA - *Heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

IC - Intervalo de confiança

IgG - Imunoglobulina G

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Kb - Quilobases

LBA - Lavado broncoalveolar
LP - Líquido pleural
mA - miliampere
MIC - *Minimum inhibitory concentration*
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
mL - Mililitro
μL - Microlitro
μM - Micromolar
MHCA - Müller-Hinton cátion ajustado
MLST - *Multilocus sequence typing*
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
MS - Ministério da Saúde
MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à metilina
NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NT - Não tipável
PA - Pró-análise
Pb - Pares de base
PBP - *Penicillin binding protein*
PCR - *Polymerase chain reaction*
PFGE - *Pulsed-field gel electrophoresis*
PM – Peso molecular
pta - gene que codifica a enzima fosfato acetiltransferase
PtC - Ponta de cateter
PVL - *Panton-Valentine leucocidin*
RNA – Ácido ribonucleico
RPM – Rotação por minuto
qsp – Quantidade suficiente para
AS - Secreção de abscesso;
SF - Secreção de ferida;
SG - Sangue
SO - Secreção ocular
SBAC – Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
SCCmec - *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*
SN - Swab nasal

Spa - *Staphylococcal protein A*

ST - Sequence type

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris Borato EDTA

TNFR - *Tumor necrosis factor receptor*

tpi - gene que codifica a enzima triosefosfato isomerase

TSB - *tryptic soy broth*

TSST - *toxic shock syndrome toxin*

UV - Ultra violeta

VISA – *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

yqiL - gene que codifica a enzima acetil coenzima A acetiltransferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.1 Principais características	19
2.2 Resistência aos antimicrobianos.....	22
2.2.1 Resistência à Penicilina	22
2.2.2 Resistência à Meticilina	22
2.2.3 Resistência à Vancomicina.....	23
2.3 Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>).....	25
2.4 HA-MRSA (<i>Healthcare-associated MRSA</i>)	26
2.5 CA-MRSA (<i>Community-associated MRSA</i>)	26
3 Métodos de tipificação genÉTICA para MRSA.....	27
3.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	27
3.2 Tipificação por Sequenciamento Multilocus (MLST)	27
3.3 Tipificação por sequenciamento do gene <i>spa</i> ou “Spa-typing”	28
4 Clones de MRSA PREVALENTES.....	28
5 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Aids	29
5.1 Epidemiologia do HIV.....	29
6 MRSA e HIV/Aids.....	31
7 MRSA e INI-Fiocruz	32
8 Objetivos	33
8.1 Objetivo geral.....	33
8.2 Objetivos específicos	33
9 MATERIAI E MÉTODOS	33
9.1 Desenho do estudo	33
9.2 População e local do estudo	34

9.3 Critérios de inclusão.....	34
9.4 Critérios de exclusão.....	34
9.5 Coleta dos espécimes clínicos	34
9.6 Cultura dos espécimes clínicos.....	35
9.7 Origem das amostras bacterianas	35
9.8 Identificação fenotípica e caracterização da resistência à meticilina	35
9.8.1 Fermentação do manitol	36
9.8.2 Coloração de Gram.....	36
9.8.3 Testes da catalase e coagulase em tubo.....	37
9.9 Criopreservação dos isolados de MRSA.....	37
9.10 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	37
9.11 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina por microdiluição em caldo.....	38
9.12 Extração do DNA bacteriano.....	40
9.13 Análise genotípica.....	41
9.13.1 Caracterização molecular da espécie	41
9.13.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
9.13.4 Caracterização molecular da resistência à meticilina (<i>mecA</i>).....	43
9.13.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	43
9.13.6 Visualização do material amplificado (gene <i>mecA</i>).....	44
9.13.7 Detecção do gene de produção da toxina PVL (Leucocidina de Pantone-Valentine).....	44
9.13.8 Reação em da Polimerase Cadeia (PCR)	45
9.13.9 Visualização do material amplificado (gene PVL)	45
9.13.10 Determinação do perfil clonal pela técnica “ <i>Spa-typing</i> ”	46
9.13.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	46
9.13.12 Visualização do material amplificado (Gene <i>spa</i>)	47

9.13.13 Determinação do perfil clonal pela técnica MLST (Multilocus Sequence Typing).....	47
9.13.14 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
9.13.15 Visualização do material amplificado pela técnica de MLST	49
9.13.16 Purificação do produto de PCR.....	49
9.14 Definição de colonização comunitária e hospitalar	50
9.15 Cálculo da prevalência global de colonização por MRSA	50
9.16 Cálculo da incidência de colonização por MRSA	50
9.17 Cálculo da prevalência global de infecção por MRSA.....	51
9.18 Cálculo da prevalência de infecção por MRSA entre os pacientes colonizados	51
9.19 Cálculo da incidência de infecção por MRSA	51
9.20 Cálculo do tempo médio de internação entre os pacientes colonizados que desenvolveram processo infeccioso	52
9.21 Dados clínicos e epidemiológicos	52
9.22 Definição de comorbidades.....	52
9.23 Análise estatística	52
11 RESULTADOS	54
12 DISCUSSÃO	70
13 LIMITAÇÕES.....	76
14 CONCLUSÃO.....	77
BLIBLIOGRAFIA	78

1 INTRODUÇÃO

O cenário da pandemia do HIV/AIDS observado em todos os continentes é considerado um problema grave de saúde pública e um desafio no âmbito mundial (Morgado *et al.*, 1998a). De acordo com o Programa Conjunto das Nações UNIDAS sobre HIV/AIDS (UNAIDS - Joint United Nations Programme on HIV/AIDS), 36,7 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo 1,8 milhões de novas infecções ocorridas anualmente, contabilizando um milhão de mortes por AIDS relatadas em 2016 (Unaid, 2017). A maior parte (95%) das novas infecções por HIV ocorre em países de baixa e média renda (Ferreira DC *et al.*, 2014).

Diversos estudos demonstram que pacientes HIV positivos apresentam maiores taxas de colonização e infecção por *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), em comparação com pacientes HIV negativos (Crum-Cianflone *et al.*, 2007; Cole and Popvich, 2013). As infecções nestes pacientes são clinicamente semelhantes as observadas na população em geral (furunculoses, celulites e abscessos), além dos quadros invasivos como bacteremia, endocardite, pneumonia e infecções osteoarticulares. Particularmente, observam-se infecções de pele nas áreas peri-inguinal e perianal, incluindo nádegas, virilhas e escroto (Diep *et al.*, 2008; Furuno *et al.*, 2011).

O Brasil, com uma população de aproximadamente 207,7 milhões de habitantes de acordo com o Banco Mundial 2016 (<https://data.worldbank.org>) ocupa o primeiro lugar nas Américas em número de casos de AIDS notificados (<https://unaid.org.br>) e apresenta uma média de 40 mil novos casos notificados por ano. Estima-se que em 2017, 511 mil pessoas estão em uso de antirretrovirais e, aproximadamente 112 mil indivíduos desconhecem o estado de portador do vírus HIV (<http://www.aids.gov.br/pt-br>). O Estado do Rio de Janeiro apresenta o segundo maior número de casos de AIDS, respondendo por 14% das notificações. A cidade do Rio de Janeiro, a segunda maior do país, tem uma população na área metropolitana de mais de 10 milhões de pessoas, sendo responsável por 90% de todos os casos de AIDS notificados no estado (Ribeiro *et al.*, 2014).

O Brasil teve sucesso em reduzir os custos dos cuidados com a saúde desses indivíduos através do uso de medicamentos antirretrovirais mais amplamente disponíveis (Okie, 2006). Em 1996, foi estabelecido um programa de acesso universal ao tratamento antirretroviral combinado (cART- combination antiretroviral therapy). O impacto desse programa pode ser observado no significativo aumento da sobrevivência e da qualidade de vida desses indivíduos (Grinsztejn *et al.*, 2013).

No entanto, as infecções bacterianas continuam entre as principais causas de morbidade e mortalidade nessa população e não parecem ter sofrido impacto significativo com a disseminação do uso da terapia antirretroviral combinada e, com frequência, evoluem para sepse (Japiassú *et al.*, 2010). Prevenir e melhorar o manejo dos pacientes com essas condições é uma prioridade. A importante participação das infecções bacterianas na morbi-mortalidade das pessoas vivendo com HIV já foi demonstrada na coorte de pacientes que recebe assistência no INI/Fiocruz (Japiassú *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014)

2 *Staphylococcus aureus*

2.1 Principais características

A primeira descrição formal do gênero *Staphylococcus* foi realizada por Rosenbach em 1884. Inicialmente associado à família Micrococcaceae (Skerman *et al.* 1980), foi reclassificado e incluído na família Staphylococcaceae (Bannerman, 2003), a qual é composta atualmente por 53 espécies e 28 subespécies (<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>), sendo que 17 delas já foram isoladas de amostras biológicas humanas (Koneman *et al.* 2001). A espécie *Staphylococcus aureus* é uma bactéria anaeróbica facultativa, imóvel e não esporulada. Morfologicamente, se apresenta como cocos Gram positivos dispostos no formato de “cachos de uva”, ou seja, agrupados (Tortora *et al.* 2005). Além dessas características, a morfologia colonial, a produção de coagulase e catalase, a capacidade de fermentação do manitol e da trealose e a produção de nuclease estável (DNAse) são fatores importantes para a definição da espécie. A reação da coagulase em tubo e o crescimento em ágar manitol são os testes mais utilizados nos laboratórios clínicos na identificação presuntiva da espécie (Kloos e Bannerman, 1999).

Staphylococcus aureus possui ampla distribuição no ambiente e cerca de 20% a 40% da população adulta apresenta colonização das narinas anteriores por este microrganismo, embora possa estar presente em outros sítios de colonização como pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina, podendo permanecer como parte da microbiota humana normal. Pode, ainda, causar infecções oportunistas importantes (Koneman *et al.* 2001)

O principal reservatório de *Staphylococcus aureus* é o ser humano. Três estados de portadores têm sido definidos quanto à colonização nasal em humanos: persistentes, intermitentes ou transitórios. Há também os não portadores (Stenehjem, Himland, 2013). A colonização é considerada como fator de risco para o desenvolvimento de infecções em diversos sítios, principalmente em pacientes que realizam hemodiálise, diálise peritoneal ambulatorial contínua e em pessoas vivendo com o vírus HIV (Stenehjem, Himland, 2013). Os processos infecciosos podem variar desde infecções cutâneas como impetigo, foliculite, furúnculos e carbúnculos até doenças potencialmente fatais como pneumonia necrosante, endocardite infecciosa, osteomielite e sepse (Liu *et al.*, 2011).

O estabelecimento de um processo infeccioso depende de uma série de substâncias capazes de auxiliar a permanência e as inúmeras ações patogênicas causadas pela bactéria e seus metabólitos no corpo humano. O conjunto dessas moléculas recebe a denominação geral de fatores de virulência (Kong, Vuong & Otto, 2006).

A cápsula é uma estrutura externa à parede celular formada por polissacarídeos e produzida pela maioria das cepas de *S. aureus*. Essa estrutura pode impedir a ação fagocitária de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e facilitar a aderência do microrganismo às células dos hospedeiros e dispositivos protéticos (Koneman *et al.* 2001). De acordo com a imunotipificação do polissacarídeo capsular, há 11 sorotipos, sendo os tipos 5 e 8 responsáveis por 70% a 80% das infecções causadas nos seres humanos (Lowy, 1998; Koneman *et al.* 2001).

A proteína A estafilocócica presente na superfície da parede celular de *S. aureus* tem a capacidade de se ligar à região Fc dos anticorpos da classe G (IgG), dificultando o processo de opsonização e ativação do sistema complemento, impedindo a fagocitose do microrganismo pelos leucócitos polimorfonucleares (Koneman *et al.* 2001). Possui, ainda, a capacidade de ativar o fator de necrose

tumoral 1 (TNFR1) presente no epitélio das vias aéreas, provocando inflamação aguda e lesão pulmonar (Gomez *et al.* 2004).

As hemolisinas possuem importante papel na sua patogenicidade como a ação citotóxica em leucócitos polimorfonucleares e eritrócitos; hidrólise da esfingomielina, um lipocarboidrato presente na membrana celular, agindo contra vários tipos celulares; indução da síntese de AMP cíclico por meio da ativação da enzima adenilato ciclase com ações semelhantes à toxina colérica (Koneman *et al.* 2001; Vandenesch, Lina & Henry, 2012).

Além das doenças invasivas, a espécie *S. aureus* tem a capacidade de causar uma variedade de enfermidades e agravar os processos infecciosos em decorrência da produção de diversas toxinas. As enterotoxinas são substâncias produzidas e secretadas, provocando quadros de gastroenterites decorrente do consumo de alimentos contaminados. Destaca-se também a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) capaz de acometer mais de um sistema orgânico ao mesmo tempo como o gastrointestinal, muscular, renal, hepático, hematológico e sistema nervoso central e a toxina esfoliativa que causa a síndrome da pele escaldada (Koneman *et al.* 2001).

A toxina denominada Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) resulta da interação sinérgica entre duas proteínas (LukS-PVL e LukF-PVL) codificadas pelos genes *pvl* (*lukS* e *lukF*) os quais são inseridos em seu cromossomo pelo fago ϕ PVL (Burst *et al.*, 2012), formando poros na membrana plasmática dos polimorfonucleares, o que determina a morte celular por necrose ou apoptose. A liberação do conteúdo citoplasmático agrava o processo inflamatório potencializando os danos teciduais, culminando na piora do quadro infeccioso (Boyle *et al.*, 2007; Saïd *et al.*, 2005).

Várias enzimas produzidas por *S. aureus* contribuem para sua patogenicidade. Dentre elas, podemos citar a catalase, com capacidade de inativar o peróxido de hidrogênio e radicais livres provenientes do sistema mieloperoxidase presente no citoplasma das células fagocitárias; a coagulase, atuando com fator protetor ao recobrir a célula bacteriana com fibrina impedindo os processos de opsonização e fagocitose; as fibrinolisinases, que degradam os coágulos de fibrina permitindo a disseminação do micro-organismo; a hialuronidase capaz de digerir a matriz extracelular nos tecidos auxiliando no processo de disseminação para áreas adjacentes à infecção; as lípases, contribuindo para a disseminação nos tecidos cutâneos e subcutâneos (Koneman *et al.*, 2001).

2.2 Resistência aos antimicrobianos

2.2.1 Resistência à Penicilina

O advento da antibioticoterapia na primeira metade do século passado proporcionou considerável avanço na prática médica e saúde pública em geral (Stein & Wells, 2010). Porém, a espécie *S. aureus* vem demonstrando ao longo do tempo notável habilidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos. Um ano após a introdução da penicilina no mercado, antibiótico da classe dos beta-lactâmicos, foi relatada a primeira amostra resistente. Tal característica se deve à aquisição de um plasmídeo capaz de codificar uma enzima denominada beta-lactamase ou penicilinase, responsável por degradar o anel beta-lactâmico presente na molécula desses antibióticos (Kejela & Bacha, 2013).

Como alternativa terapêutica, foi introduzida no mercado, em 1959, a meticilina (Parker & Jevons, 1964), uma penicilina semi-sintética não hidrolisável pelas beta-lactamases (Chaterjee & Otto, 2013). Entretanto, foi reportada já em 1961 a primeira cepa de *S. aureus* resistente à meticilina, sendo denominada MRSA (do inglês, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), tipicamente causando infecções em pacientes hospitalizados (Baba *et al.*, 2002; Havaei *et al.*, 2012).

2.2.2 Resistência à Meticilina

A resistência aos beta-lactâmicos não hidrolisáveis pelas beta-lactamases, tais como a meticilina e seu congênere, a oxacilina, recebe a denominação geral de “resistência à meticilina” e é considerada de grande importância, uma vez que estes antimicrobianos são a primeira linha para o tratamento das infecções por *S. aureus* resistentes à penicilina (Martineau *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002). Amostras de MRSA são consideradas resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos (CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2016). O sucesso do mecanismo de resistência se deve à aquisição do gene *mecA*, por cepas sensíveis de *Staphylococcus aureus* (MSSA - *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*), o qual está inserido em um elemento genético móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), capaz de ser transferido entre espécies distintas de *Staphylococcus*

(Garza-González *et al.*, 2010). A expressão deste gene permite a essas cepas, agora resistentes (MRSA), a codificação de uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a ou PBP2', do inglês *penicillin binding protein*) com reduzida afinidade aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, tornando ineficiente a atividade bactericida do fármaco (Ito *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2014).

2.2.3 Resistência à Vancomicina

Devido à crescente prevalência dos MRSA nos hospitais dos Estados Unidos no início da década de 1980, a vancomicina passou a ser a droga de escolha para o tratamento empírico das infecções causadas por MRSA (Maranan *et al.*, 1997; Appelbaum, 2007; Khatib *et al.*, 2013). Seu mecanismo de ação contra bactérias Gram positivas decorre da ligação ao resíduo D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) localizado no carbono terminal dos precursores do peptidoglicano, constituinte base da parede celular (Howe *et al.*, 1998).

Mesmo com a utilização na prática clínica desde a década de 1960, o perfil de resistência adquirida a este antimicrobiano somente foi observado vários anos depois. Em 1996, foi descrito no Japão o primeiro caso de infecção causada por MRSA com resistência intermediária à vancomicina (VISA - *vancomycin-intermediate S. aureus*), com concentração inibitória mínima (CIM) de 8 µg/mL (CDC, 1997; Wang *et al.*, 2006; Appelbaum, 2007; Havaei *et al.*, 2012). Apesar de ter sido descrita a transferência *in vitro* do operon *vanA* entre enterococos e estafilococos (Bryce *et al.*, 2000; Havaei *et al.*, 2012; Courvalin, 2006), nenhum gene ou plasmídeo carregando *vanA* ou outros genes (*vanB*, *vanC* ou *vanD*) que medeiam a resistência total à vancomicina foi encontrado nessa amostra (Hiramatsu *et al.*, 2001; Musta *et al.*, 2009; Havaei *et al.*, 2012).

Tal fato sugeriu que o mecanismo presente nas amostras VISA era diferente daqueles mediadores de resistência nos enterococos. Mudanças na composição e espessura da peptidoglicana poderia estar associado ao fenótipo de resistência intermediária (Boyle-Vavra *et al.*, 2000). O aumento na deposição de D-Ala-D-Ala nas camadas mais externas da parede celular tornando-a mais espessa, aumenta os sítios de ligação à vancomicina, diminuindo sua eficácia devido à competição (Havaei *et al.*, 2012).

O primeiro relato de uma amostra clínica de MRSA plenamente resistente à vancomicina (VRSA, do inglês *vancomycin-resistant S. aureus*) surgiu em 2002 na cidade de Michigan, EUA. O segundo relato ocorreu na Pennsylvania, EUA, dois meses depois (CDC, 2002; Havaei *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2008). Estas amostras apresentavam o determinante de resistência *vanA*, com CIM para vancomicina > 128 µg/mL, 32 µg/mL para teicoplanina e 16 µg/mL para a oxacilina. Em 2004, o terceiro caso de VRSA nos EUA foi relatado em Nova Iorque (CDC, 2004; Zhu *et al.*, 2008). Desde então, outros relatos de VRSA foram divulgados nos Estados Unidos, Japão, França, Coreia, África do Sul, Escócia, Índia e Irã (Havaei *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013; Yousefi *et al.*, 2017).

No Brasil, foram relatados entre os anos de 1998 e 1999, cinco amostras de VRSA em um hospital na cidade de São Paulo, onde todos apresentaram CIM para a vancomicina igual a 8 µg/mL. Naquele momento, todas as amostras foram classificadas como resistentes conforme recomendações do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Porém, nenhum gene de resistência (*vanA*, *vanB* e *vanC*) foi identificado, sendo detectado apenas o espessamento da parede celular (Oliveira *et al.*, 2001). Em 2012, foi isolado, no Laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), o primeiro VRSA apresentando o gene *vanA*, causando infecção na corrente sanguínea, bem como o isolamento de *Enterococcus faecalis* em “swab” de vigilância do mesmo paciente, apresentando o determinante *vanA* de resistência à vancomicina (Rossi *et al.*, 2014).

O mecanismo de resistência mediado pelo gene *vanA*, o único até então detectado em VRSA, se deve à síntese de precursores da parede celular com reduzida afinidade à vancomicina. O resíduo D-alanina (D-ala) terminal é substituído por D-lactato (D-lac), alterando o alvo de ligação, proporcionando altos níveis de resistência à vancomicina e teicoplanina (Courvalin, 2006). Vários casos de falha terapêutica passaram a ser relatados no tratamento de pacientes infectados por MRSA que apresentavam CIM para a vancomicina ≥ 4 µg/ml, até então considerados sensíveis (Musta *et al.*, 2009). Tal fato serviu de base, em janeiro de 2006, para a redefinição pelo CLSI, antigo NCCLS, dos pontos de corte para a vancomicina. Com a nova definição, MRSA com CIM ≤ 2 µg/ml são sensíveis, entre 4 e 8 µg/ml são intermediários e com CIM ≥ 16 µg/ml são resistentes (Wang *et al.*, 2006; Musta *et al.*, 2009).

A observação do aumento da CIM dentro do valor de sensibilidade foi denominada “MIC creep” e casos de falha terapêutica foram relatados em pacientes infectados por estirpes de MRSA com CIM de 2, 1,5 e 1 µg/ml (Sakoulas *et al.*, 2004; Musta *et al.*, 2009). Soma-se a este fato o número dos casos de falha terapêutica associado às cepas VISA e h-VISA (heterogeneous-VISA). Vários casos de infecções por estas cepas (h-VISA) têm sido amplamente reportados pelo mundo, as quais se caracterizam por uma população bacteriana sensível que apresenta subpopulações com resistência intermediária à vancomicina (Wang *et al.*, 2006).

A técnica de disco-difusão empregando disco de vancomicina-30µg não é capaz de diferenciar cepas sensíveis de intermediárias, além de não correlacionar o diâmetro do halo com o valor da CIM. O laboratório de bacteriologia deve ser capaz de realizar a identificação do agente bacteriano e determinar a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos mais utilizados, dispondo de técnicas rápidas e reprodutíveis. A metodologia da microdiluição em caldo é considerada como método padrão para obtenção da CIM e deve ser realizada para todas as amostras de *Staphylococcus aureus*, a fim de determinar o perfil de susceptibilidade frente à vancomicina (CLSI, 2015).

2.3 Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

A estrutura do SCC*mec* é formada por um conjunto de genes que se dividem em dois complexos gênicos essenciais: o complexo gênico *mec* e o complexo *ccr* (ITO *et al.* 2003). O complexo gênico *mec* apresenta em sua constituição as sequências de inserção IS431 e/ou IS1272, o gene *mecA* e os genes regulatórios *mecI* e *mecR1*. O complexo gênico *ccr* é constituído pelos genes *ccrA*, *ccrB* ou *ccrC*, responsáveis pela codificação das recombinases, enzimas que medeiam a integração e excisão do SCC*mec* no cromossomo, ou seja, são responsáveis pela mobilidade do cassete cromossômico (Zhang *et al.*, 2009).

A parte restante do SCC*mec* é composta pela região J, a qual está subdividida (J1, J2 e J3) de acordo com a sua localização no SCC*mec*, contendo basicamente genes de resistência aos antibióticos. Os subtipos e tamanho do SCC*mec* são determinados por variações observadas na região J em uma mesma combinação *mec-ccr*. (Ito *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009).

Até o momento, onze tipos de SCCmec (I – XI) foram definidos (Shore *et al.*, 2011). Os tipos de I a V apresentam distribuição global (Zhang *et al.*, 2009) e, anteriormente, as variantes IV e V eram associadas às linhagens comunitárias, apresentando sensibilidade à maioria dos antibióticos disponíveis (Okuma *et al.*, 2002), ao passo que, os tipos I, II e III eram identificados como cepas nosocomiais, apresentando resistência a maioria dos antimicrobianos aprovados pelos critérios internacionais (Strandén *et al.*, 2009). Esta classificação tem sido substituída por critérios de tipificação genética para definição dos complexos clonais.

2.4 HA-MRSA (*Healthcare-associated MRSA*)

Staphylococcus aureus resistente à metilina emergiu na década de 1960 no contexto das infecções relacionadas aos cuidados com a saúde, ou seja, restringia-se ao ambiente hospitalar, sendo denominado HA-MRSA (do inglês, *Healthcare-associated MRSA*) (Jevons, 1961; Hidron *et al.*, 2010). Foi estabelecido um grupo definido de fatores de risco de exposição ao MRSA, incluindo hospitalização e procedimento cirúrgico recente, hemodiálise, utilização de cateter vascular, bem como internação por longos períodos (Farley *et al.*, 2015).

2.5 CA-MRSA (*Community-associated MRSA*)

Nos últimos 20 anos, algumas estirpes passaram a prevalecer como importante causa das infecções originadas na comunidade, sendo denominadas CA-MRSA (do inglês, *Community-associated MRSA*), tornando-se de grande relevância para os sistemas de saúde (Naimi *et al.*, 2003; Imaz *et al.*, 2015).

As infecções por CA-MRSA acometem mais frequentemente pessoas jovens, atletas (principalmente em esportes de contato), militares, populações encarceradas, e indivíduos saudáveis sem histórico de exposição às instituições de saúde (David *et al.*, 2008). Apresentam-se normalmente sob a forma de infecções de pele e tecidos moles, como furunculose (Cole & Popovich, 2013). No início dos anos 1990, após a morte de crianças com o quadro de pneumonia necrosante associada à infecção por cepas CA-MRSA, sugeriu-se que estas seriam mais virulentas que aquelas HA-MRSA. Tal fato se deve à capacidade que algumas cepas CA-MRSA apresentam em produzir uma potente citotoxina, a PVL (*Panton-Valentine leucocidin*). Os genes da

PVL são inseridos no cromossomo bacteriano pela ação de um bacteriófago, vírus que infectam exclusivamente bactérias. A expressão desses genes é capaz de acarretar a lise dos glóbulos brancos, causando o agravamento do quadro infeccioso, culminado em infecções graves e doenças invasivas, o que resulta em quadros de bacteremia, pneumonia necrosante e fasciíte necrosante (Rossney *et al.*, 2007; Cole & Popovich, 2013).

3 MÉTODOS DE TIPIIFICAÇÃO GENÉTICA PARA MRSA

Os clones de MRSA normalmente são caracterizados por métodos de tipificação molecular, incluindo a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a tipificação por sequenciamento multilocus (MLST) e *spa typing* (tipificação por sequenciamento do gene *spa*, que codifica a proteína A).

3.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE analisa o polimorfismo do DNA cromossômico, sendo considerado o método padrão na investigação epidemiológica de surtos por cepas com estreita relação genética. O método consiste na utilização de enzimas de restrição específicas que, após o processo de digestão e separação de fragmentos de DNA de todo o genoma bacteriano, gera um *DNA fingerprinting* do micro-organismo que será comparado com perfis de clones já conhecidos (Stefani *et al.*, 2012). Possui alto poder discriminatório do perfil clonal e é a mais utilizada no Brasil, embora tenha como desvantagens a demora e a dificuldade técnica de execução, além de não dispor de uma nomenclatura universalmente padronizada (Struelens *et al.*, 2009; Stefani *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2015).

3.2 Tipificação por Sequenciamento Multilocus (MLST)

A técnica *Multilocus sequence typing* (MLST) baseia-se na análise de sequências de fragmentos de sete genes constitutivos (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *pta*, *tpiA* e *yqiL*) de *S. aureus*. Um alelo distinto é atribuído a cada uma das diferentes sequências de cada gene, resultando em um perfil alélico designado *sequence-type* (ST). Amostras com mais de cinco alelos idênticos são agrupadas em um mesmo

complexo clonal (CC) (Struelens *et al.*, 2009; Stefani *et al.*, 2012). O método possui nomenclatura padronizada e fácil portabilidade, mas ainda tem custo elevado e baixo poder discriminatório em situações de surto hospitalar (Struelens *et al.*, 2009; Stefani *et al.*, 2012).

3.3 Tipificação por sequenciamento do gene *spa* ou “Spa-typing”

O método *Spa typing* é feito pelo sequenciamento de um único locus gênico, determinando o polimorfismo da sequência da região variável X do gene *spa*. Este gene codifica a proteína de superfície estafilocócica A (Spa). O tipo de *spa* é deduzido da ordem de repetições específicas a cada 24 pares de bases (pb) de nucleotídeos constituintes da região variável X do gene *spa*. A cada sequência é atribuído um código numérico e a sequência desses códigos pode ser inserida na base de dados digital (<http://www.spaserver.ridom.de>), permitindo o registro e as comparações entre sequências de *S. aureus* descritas em diferentes partes do mundo. Este método, além de sua especificidade, tornou-se o mais popular para tipificação de MRSA devido às suas muitas vantagens práticas, incluindo o alto rendimento, reprodutibilidade e completa portabilidade dos dados (Shopsin *et al.*, 1999; Harmsen *et al.*, 2003; Struelens *et al.*, 2009; Stefani *et al.*, 2012).

4 CLONES DE MRSA PREVALENTES

Atualmente, existem cinco linhagens genéticas distintas de CA-MRSA globalmente predominantes: ST1-IV-USA400, ST8-IV-USA300, ST30-IV, ST59-V e ST80-IV (David & Daum, 2010; Sowash & Uhlemann, 2014). Os dois últimos podem ser considerados pandêmicos, pois foram isolados repetidamente em todos os continentes (Deleo *et al.* 2010; Monecke *et al.* 2011). Historicamente, no Brasil, prevalece na maioria dos hospitais o clone epidêmico brasileiro (*BEC, Brazilian Epidemic Clone*), caracterizado por carrear o SCC*mec* tipo IIIa, apresentar multirresistência e não produzir a PVL (Costa *et al.*, 2016). Porém, estudos recentes demonstraram uma provável mudança no perfil genético das amostras de MRSA circulantes nos hospitais brasileiros, visto que estirpes de diferentes complexos clonais tem sido isoladas em pacientes internados incluídos nos critérios de colonização e infecção adquiridos no ambiente hospitalar (Chamon *et al.*, 2017).

5 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E AIDS

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um membro da família Retroviridae, pois seu genoma é composto por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) e pertencem ao gênero *Lentivirus* (Requejo, 2006). A característica comum entre as retrovírus é a ausência do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a necessidade de se ligar a uma célula hospedeira a fim de replicar o seu material genético, ou seja, são incapazes de se replicar fora de células hospedeiras vivas (Sundquist Kräusslich, 2012). Dois vírus relacionados, HIV-1 e HIV-2 foram identificados como os agentes etiológicos da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*) (Morgado *et al.*, 1998b). Enquanto o HIV-2 está basicamente restrito ao continente Africano e dividido em dois principais subgrupos (A e B), o HIV-1 apresenta distribuição global (Morgado *et al.*, 1998b) e está dividido em quatro subgrupos (M, N, O e P), sendo o grupo M a forma pandêmica, infectando milhões de pessoas em todo o mundo (Sharp & Hahn, 2011).

A AIDS, causada pelo vírus HIV, é uma infecção sexualmente transmissível. O contato sexual com uma pessoa infectada sem a proteção com preservativo masculino ou feminino, é principal forma de contágio. A transmissão também pode ocorrer verticalmente, da mãe para o filho, durante a gravidez, no momento do parto ou pela amamentação, através da transfusão de sangue contaminado e pelo compartilhamento de agulha contaminada entre usuários de drogas injetáveis (<http://www.aids.gov.br/pt-br>).

5.1 Epidemiologia do HIV

A partir da identificação da AIDS em 1981, um marco histórico foi estabelecido no contexto das enfermidades infecciosas devido à extensão e magnitude dos danos causados às populações infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Brito, Castilho e Szwarcwald, 2001).

O segmento populacional inicialmente acometido pela epidemia da AIDS eram os homossexuais e bissexuais masculinos, correspondendo a 71% dos casos notificados em 1984. Atualmente, há o predomínio da transmissão heterossexual com aumento

significativo dos casos em mulheres (Brito, Castilho e Szwarcwald, 2001; Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017)

A maior concentração dos casos de AIDS registrados no Brasil de 1980 a junho de 2016 está nos indivíduos com idade entre 25 e 39 anos para ambos os sexos, correspondendo a 53% dos homens e, 49,4% das mulheres, nessa faixa etária. Neste mesmo período, foram registrados 842.710 casos de AIDS, sendo notificados anualmente no país, uma média de 41,1 mil casos nos últimos cinco anos, com uma taxa média de detecção de 20,7 casos/100 mil habitantes, mantendo-se praticamente estável nos últimos dez anos (Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017).

O Brasil, com uma população de aproximadamente 207,7 milhões (www.worldbank.org), ocupa o primeiro lugar nas Américas em número de casos de AIDS notificados, contabilizando 48.000 mil novos casos notificados em 2016 (UNAIDS, 2017). O Estado do Rio de Janeiro tem o segundo maior número de casos de AIDS, respondendo por 14% das notificações. A cidade do Rio de Janeiro, a segunda maior do país, tem uma população na área metropolitana de mais de 10 milhões de pessoas, sendo responsável por 90% de todos os casos de AIDS no estado (Ribeiro *et al.*, 2014).

No final do século 20, mais de 21 milhões de pessoas no mundo inteiro morreram de AIDS, mais de 34 milhões viviam com infecção por HIV e mais de 95% das pessoas infectadas pelo HIV residiam em países em desenvolvimento (De Cock, Jaffe & Curran, 2012). No âmbito mundial, até o final de 2015, houve um aumento do número de casos prevalentes, contabilizando 37 milhões de pessoas vivendo com o HIV e 1,9 milhões de novos casos identificados (Grinsztejn *et al.*, 2017).

A prevalência de infecção pelo HIV se estabilizou em cerca de 0,8% no início do século 21 e, em 2010, 1,5 milhões de mortes estimadas por Aids representaram 2,8% das 52,8 milhões de mortes a nível mundial (Lozano *et al.*, 2012).

Do início da epidemia de AIDS até dezembro de 2014, foram identificados no território nacional 303.353 óbitos cuja causa básica foi a AIDS. O coeficiente de mortalidade padronizado para o Brasil demonstrou um leve decréscimo de 5%, passando de 5,9 óbitos/100 mil habitantes em 2006 para 5,6 em 2015. Os estados do Rio Grande do Sul (10,2 óbitos/100 mil hab.), Rio de Janeiro (8,7), Amazonas (8,7) e Pará (8,6) apresentaram coeficiente de mortalidade superior à média nacional. Do total de óbitos por AIDS registrados no Brasil, 215.212 (70,9%) ocorreram entre

homens e 88.016 (29,1%) entre mulheres. A razão de sexos se manteve em 20 óbitos em homens para cada 10 óbitos em mulheres entre 2006 e 2015 (MS, 2016).

6 MRSA E HIV/AIDS

Tem sido observado, em diversos estudos, que pacientes HIV positivos apresentam maiores taxas de colonização e infecção por MRSA, em comparação com pacientes HIV negativos (Crum-Cianflone *et al.*, 2007; Cole & Popovich, 2013). O HIV por si só é considerado como um fator para determinar a colonização por MRSA. Foram observadas taxas de colonização de 0% a 17% entre pacientes ambulatoriais e 17% a 31% para pacientes internados (Hidron *et al.*, 2010).

As infecções nestes pacientes são clinicamente semelhantes às observadas na população em geral (furunculoses, celulites e abscessos), além dos quadros invasivos como bacteremia, endocardite, pneumonia e infecções osteoarticulares. Particularmente, observa-se infecções de pele nas áreas peri-inguinal e perianal, incluindo nádegas, virilhas e escroto (Diep *et al.*, 2008; Furuno *et al.*, 2011).

O tratamento antirretroviral combinado aumentou a expectativa de vida das pessoas vivendo com HIV, seja pediátrico ou adulto, reduzindo as infecções oportunistas através do restabelecimento do sistema imunológico, com conseqüente melhora da qualidade de vida (Ferreira *et al.*, 2014). Entretanto, a resposta imune inata em pessoas vivendo com HIV, demonstrou significativa disfunção dos neutrófilos podendo aumentar o risco de infecção bacteriana (Hidron *et al.*, 2010).

O recrutamento ativo dos neutrófilos por quimiotaxia até o local da infecção, atua como a primeira etapa para a eliminação da bactéria. Foi demonstrado uma redução em 45% na quimiotaxia dos neutrófilos em pessoas vivendo com HIV em comparação a indivíduos saudáveis. Estudos também demonstraram que a capacidade fagocítica oxidativa dos neutrófilos pode estar associada à redução em 20% da capacidade bactericida intracelular de *S. aureus* observada em HIV positivos (Hidron *et al.*, 2010).

Prevenir e melhorar o manejo dos pacientes com essas condições é uma prioridade. A importante participação das infecções bacterianas na morbi-mortalidade dos indivíduos infectados pelo HIV já foi demonstrada na coorte de pacientes que recebe assistência no INI/Fiocruz (Ribeiro *et al.*, 2014). Em 90% dos casos, as infecções relacionadas aos cuidados com a saúde foram a causa de sepse, sendo

que em 11% casos foram identificados *S. aureus* como o agente causal (Japiassú *et al.*, 2010).

7 MRSA E INI-FIOCRUZ

Entre janeiro de 1993 a novembro de 1994, foram identificadas as primeiras amostras de MRSA no Hospital Evandro Chagas, atualmente denominado Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, totalizando 26 amostras obtidas de 15 pacientes (14 HIV positivos e 1 HIV negativo) com processos de colonização e/ou infecção. A partir daí, medidas foram adotadas a fim de interromper a disseminação deste micro-organismo, incluindo programas educacionais, descolonização dos pacientes e equipe de saúde com mupirocina, vigilância dos pacientes colonizados e/ou infectados por cultura de “swab” nasal e manutenção desses indivíduos em isolamento de contato (Teixeira, Lourenço & Figueiredo, 1996).

Com o objetivo de monitorar o processo de colonização nasal por MRSA dos pacientes admitidos no Hospital Evandro Chagas, foi estabelecido pelo Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios no mesmo período em que foram adotadas pelo hospital as medidas de controle, o Programa de Busca Ativa, em que colaboradores do Laboratório passaram a realizar semanalmente a coleta de “swab” nasal de vigilância de todos os pacientes internados.

Em 06 de janeiro de 1997, foi sancionada no Brasil a Lei nº 9.431 com o intuito de monitorar e obter dados sobre as infecções relacionadas aos cuidados com a saúde, dispendo sobre a obrigatoriedade dos hospitais em criar uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) e manter um Programa de Controle de Infecções Hospitalares (Schuenck *et al.*, 2009). Tal fato possibilitou a coordenação das atividades de vigilância epidemiológica entre a CCIH e o Programa de Busca Ativa, que manteve suas atividades até o ano de 2015. A partir daí, foram realizadas apenas as culturas dos “swabs” nasais de vigilância coletados pela equipe de saúde.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo geral

Avaliar a colonização e infecção por MRSA em pacientes HIV positivos hospitalizados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-INI-Fiocruz no período entre 01 de janeiro de 2010 a 31 de dezembro de 2015.

8.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a prevalência de colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina nos pacientes HIV positivos no momento da internação;
- b) Determinar a incidência de colonização e infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina durante a hospitalização;
- c) Verificar os fatores de risco associados à morbidade e mortalidade nos casos de colonização e infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;
- d) Caracterizar genotipicamente, identificando o perfil clonal dos *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina nesta população;
- e) Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) para vancomicina.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Desenho do estudo

Este é um estudo de coorte retrospectivo em um único centro, com amostras bacterianas de colonização nasal e infecção, coletadas no período entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz em 22 de novembro de 2016 (CAAE: 61727316.7.0000.5262). Consta anexado a este documento a cópia do parecer (Anexo 1).

9.2 População e local do estudo

Pacientes HIV positivos internados no INI (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI – Fiocruz), no período entre 01 janeiro de 2010 e 31 dezembro de 2015. Trata-se de um hospital referência para o atendimento a pessoas vivendo com HIV, localizado na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, com 32 leitos ativos sendo cinco de Unidade de Terapia Intensiva.

9.3 Critérios de inclusão

- 1- Ser HIV positivo.
- 2- Ter sido internado no período de 01/01/2010 a 31/12/2015.
- 3- Ter sido submetido à coleta de “swab” nasal para pesquisa de MRSA.

9.4 Critérios de exclusão

- 1- Ser HIV negativo.
- 2- Ser HIV positivo e não ter sido internado no período 01/01/2010 a 31/12/2015.
- 3- Ser HIV positivo, internado no período 01/01/2010 a 31/12/2015 e não ter sido submetido à coleta de “swab” nasal para pesquisa de MRSA.

9.5 Coleta dos espécimes clínicos

Foram coletados “swabs” nasais de vigilância de todos os pacientes admitidos, no momento da internação pela equipe de saúde e, semanalmente, pela equipe do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios, durante todo o período de permanência do paciente no hospital.

A coleta foi realizada através da introdução de “swab” de algodão estéril nas narinas anteriores de cada paciente, realizando movimentos rotatórios em toda a cavidade nasal. O material foi enviado imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios - INI – Fiocruz para realização da cultura.

Os espécimes clínicos de pacientes com suspeita de processo infeccioso foram coletados pela equipe de saúde e enviados ao laboratório para realização da cultura.

9.6 Cultura dos espécimes clínicos

Os “swabs” nasais foram cultivados em ágar manitol salgado (Becton Dickinson) e incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 24 a 48 h sob condições de aerobiose.

Os espécimes clínicos de pacientes com suspeita de processo infeccioso coletados pela equipe médica e enviados ao laboratório, foram semeados em ágar sangue de carneiro 5% (AS) (Becton Dickinson) e ágar chocolate VX (Becton Dickinson) conforme orientações descritas nos POP's do setor para cada tipo de material clínico e, incubados em estufa bacteriológica (De Leo) a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24h a 48 h em condições de microaerofilia.

As amostras de sangue foram coletadas e inoculadas em frasco de hemocultura automatizada e enviadas ao laboratório, onde foram introduzidas no aparelho BD Bactec 9050 Blood Culture System (Becton Dickinson). As que positivaram (sugestivo de crescimento bacteriano), foram semeadas em ágar chocolate VX (Becton Dickinson) e incubadas em estufa bacteriológica (De Leo) a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24h, em condições de microaerofilia.

9.7 Origem das amostras bacterianas

Foram utilizadas amostras bacterianas isoladas e identificadas no Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios, a partir da cultura dos “swabs” nasais e dos espécimes clínicos com suspeita de processo infeccioso, oriundas de pacientes HIV positivos internados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI - Fiocruz, coletadas no período entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015.

9.8 Identificação fenotípica e caracterização da resistência à meticilina

As colônias manitol positivas obtidas das culturas dos “swabs” nasais em ágar manitol salgado foram selecionadas e submetidas à coloração de Gram, aos testes da catalase e coagulase em tubo. As que se apresentaram como cocos Gram positivos e com resultados positivos para os testes da catalase e coagulase foram consideradas *Staphylococcus aureus*.

As colônias identificadas como cocos Gram positivos, obtidas após cultura dos espécimes clínicos coletados dos pacientes com suspeita de processo infeccioso, que apresentaram resultados positivos para os testes da catalase e coagulase em tubo, foram consideradas *Staphylococcus aureus*.

O teste de sensibilidade para identificar o fenótipo de resistência à meticilina foi realizado pelo método de Kirby-Bauer (disco-difusão), utilizando o disco de cefoxitina-30 µg (Oxoid) como preditor de resistência, conforme recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2010/15). Todos isolados de *S. aureus* que apresentaram resistência à cefoxitina (halo de inibição com diâmetro ≤ 21 mm), foram considerados MRSA.

9.8.1 Fermentação do manitol

As colônias amarelas, indicativas da fermentação do manitol em ágar manitol salgado, foram consideradas sugestivas de *S. aureus* e reisoladas em AS para posterior identificação e confirmação da espécie.

9.8.2 Coloração de Gram

A característica morfotintorial foi analisada utilizando a técnica de coloração de Gram. As colônias manitol positivas obtidas a partir da cultura dos “swabs” nasais e, aquelas com morfologia sugestiva, apresentaram ou não beta-hemólise em AS após culturas dos espécimes clínicos, foram selecionadas. Foi confeccionado um esfregaço em lâmina de microscopia e fixado na chama do bico de Bunsen. A coloração foi realizada adicionando solução de cristal violeta como corante primário por 1 min. Em seguida, foi adicionado solução de lugol por 1 min e descorado com solução de álcool/acetona por 5 a 10 s, seguindo com a adição de solução de fucsina como corante de contraste por 30 s. Entre cada etapa e ao final da coloração, o esfregaço foi lavado delicadamente em água corrente. Após secagem ao ar livre, o esfregaço foi observado em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X). Cocos Gram positivos foram selecionados para posterior identificação e confirmação da espécie

9.8.3 Testes da catalase e coagulase em tubo

Uma colônia sugestiva de *S. aureus* foi colocada sobre a superfície de uma lâmina, obtida a partir do crescimento em AS, espalhando-a homogeneamente com o auxílio de uma alça bacteriológica. Em seguida, foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% v/v. A formação de bolhas foi indicativa da produção da enzima catalase, característica de *S. aureus* (Koneman *et al.* 2001). Foi usada como controle positivo a cepa ATCC 25923.

O teste da coagulase em tubo foi realizado utilizando o kit BBL™ Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA (Becton Dickinson), seguindo as orientações do fabricante. O kit contém plasma de coelho liofilizado o qual foi reidratado com 3,0 mL de água destilada. Uma alíquota de 500 µL foi transferida para um tubo com tampa e duas a quatro colônias obtidas a partir do crescimento em AS foram transferidas para o tubo com plasma. Após incubação em estufa bacteriologia a 37°C por um período de 4h a 24 h, o tubo foi analisado. O teste foi considerado positivo quando houve formação de coágulo no tubo, característico de *S. aureus*. Foi usada como controle positivo a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

9.9 Criopreservação dos isolados de MRSA

Todas as amostras de MRSA, tanto de colonização nasal quanto de infecção, foram criopreservadas em caldo TSB (Difco), com 15% de glicerol (MerK) (v/v), a -20 °C.

9.10 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Amostras de MRSA isoladas de infecção além do disco de cefoxitina, foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos (Oxoid) pelo método de disco-difusão, conforme : amoxicilina-ácido clavulânico (20/10µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), ciprofloxacina (5µg), clidamicina (2µg), eritromicina 15(µg), gentamicina (10µg), levofloxacina(5µg), linezolid (30µg), penicilina (10U), quinupristin-dalfopristin (15µg), rifampicina (5µg), sulfametoxazol-trimetoprima (23,75/1,25µg) e tetraciclina (30µg), conforme recomendado pelo CLSI vigente na data da identificação (CLSI 2010; CLSI 2011; CLSI 2012; CLSI 2013; CLSI 2014; CLSI 2015). A partir do

crescimento em AS, três a cinco colônias isoladas foram selecionadas e suspensas em um tubo com 3,0 mL de solução salina estéril (cloreto de sódio a 0,9%) com auxílio de uma alça bacteriológica até atingir uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Utilizando um “swab” seco e estéril, a suspensão foi semeada por toda a superfície uma placa contendo ágar Mueller-Hinton (Becton Dickinson), a fim de obter um crescimento confluyente. Em seguida, foram adicionados os discos de antimicrobianos e a placa foi incubada em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18h a 24h. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os valores obtidos foram analisados conforme orientações do CLSI para definição do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923 foi utilizada como controle dos testes.

9.11 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina por microdiluição em caldo

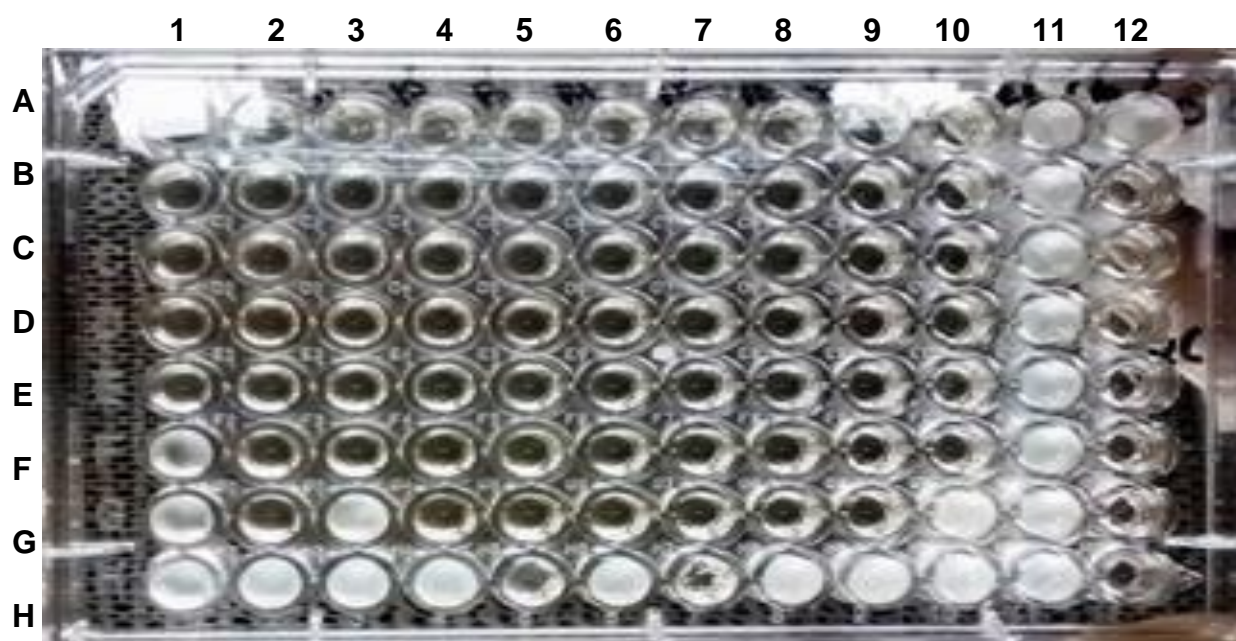
Em conformidade com as normas estabelecidas pelo CLSI, a determinação da CIM para a vancomicina foi realizada para todas as amostras de MRSA (CLSI 2015).

As amostras criopreservadas foram reativadas em AS e incubados em estufa bacteriológica como descrito no item 9.6. Em seguida, uma única colônia foi semeada em AS e utilizada no teste de obtenção da CIM e nos testes moleculares após extração do DNA.

A partir do crescimento em AS, três a cinco colônias foram selecionadas para confeccionar a suspensão bacteriana com turvação padronizada na escala 0,5 MacFarland. Como recurso de padronização da suspensão, foi utilizado o aparelho do Vitek-2, DensiCHEK-plus (nefelômetro) e seus calibradores. Foram transferidos 50 μL da suspensão bacteriana para um tubo contendo 10 mL de caldo Müller-Hinton cátion ajustado - MHCA (Becton Dickinson) estéril. Em uma placa de microtitulação (96 poços) previamente preparada contendo em cada poço 100 μL do caldo MHCA estéril, foram aplicados 100 μL da solução de vancomicina (Merck), na concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quatro vezes a desejada no primeiro ponto da curva, realizando diluições seriadas até o último ponto da curva de concentrações, variando de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, foi acrescentado a todos os poços da microplaca 100 μL da suspensão bacteriana diluída. As colunas 11 e 12 foram reservadas para o controle

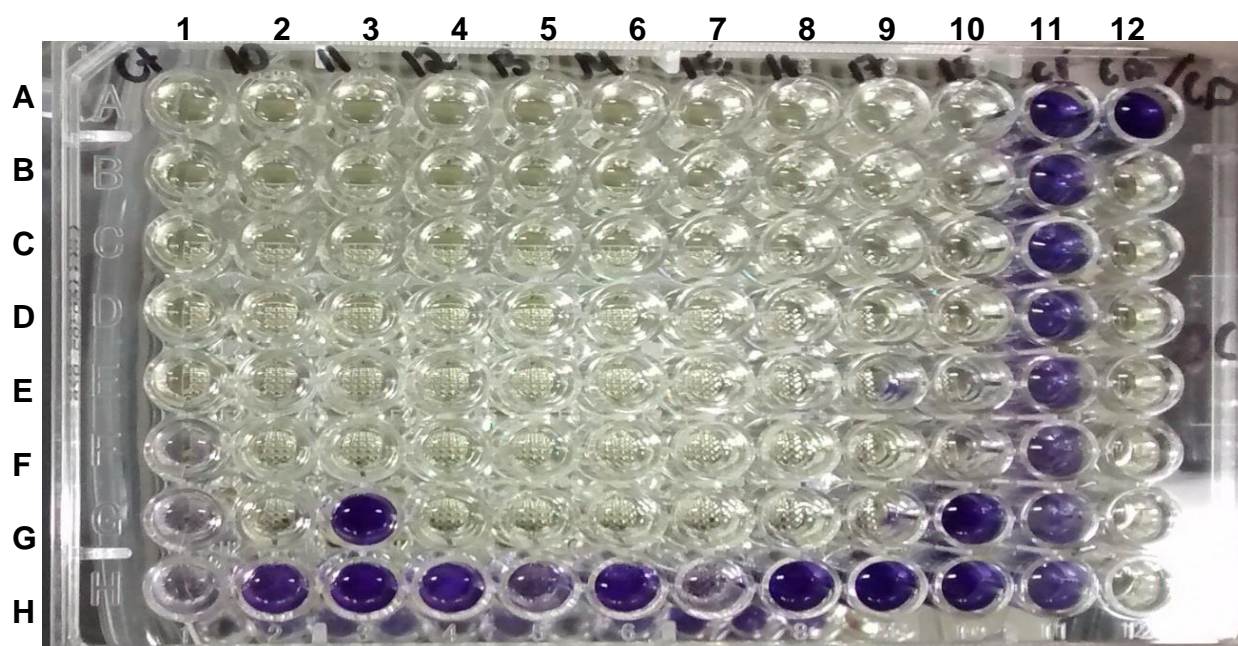
interno do crescimento bacteriano, controle interno do fármaco e controle do caldo Müller-Hinton. Após a preparação do painel de concentrações, este foi incubado em aerobiose a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. Na primeira etapa de avaliação, foi considerado o crescimento bacteriano evidenciado pela turvação do meio (Figura 1). Na etapa subsequente, foi adicionado 100 μL da solução do agente oxirredutor na concentração de 0,4 mg para cada 2,5 mL da solução contendo álcool P.A. 40% e 60% de solução tween 80 a 10% (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide – Sigma, USA). Após um período de incubação de 1h a $35\pm 1^\circ\text{C}$, foi realizada a leitura considerando o aparecimento da cor roxa como indicativo de crescimento bacteriano (Figura 2). Os valores das CIM obtidos nas duas etapas de leitura foram comparados e o resultado da última leitura foi considerado. Os testes foram realizados em triplicata para todas as amostras. Foi utilizada como controle positivo a cepa *S. aureus* ATCC® 25923.

Figura 1: Avaliação da CIM observando a turvação



Poços: A1-H1 (controle positivo - ATCC® 29212); A2-H2, A3-H3, A4-H4, A5-H5, A6-H6, A7-H7, A8- H8, A9-H9, A10-H10 (Amostras de MRSA); A11-H11 e A12 (controle do crescimento das amostras de MRSA); B12-E12 (controle do fármaco); F12-H1 (controle do caldo MHCA)

Figura 2: Avaliação da CIM observando a formação de cor



9.12 Extração do DNA bacteriano

As amostras criopreservadas foram reativadas em AS, incubadas em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 48 h sob condições de aerobiose. Em seguida, uma única colônia foi selecionada, inoculada em 5,0 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Becton Dickinson) e incubado em estufa com agitação de 200 rpm a 37°C durante 24h. O DNA bacteriano foi extraído utilizando o KIT da Qiagen (QIAamp® DNA Mini Kit) seguindo o protocolo do fabricante. Foram transferidos 1000 μL do crescimento bacteriano para um microtubo de 1,5 mL sendo centrifugado por 10 min a 7.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 180 μL do tampão de lise (Tris HCl, EDTA e Triton X), acrescido de 3,6 μL de lisostafina (10mg/mL) e 36 μL de lisozima (50 mg/ml). Após incubação a 37°C durante 30 min, foram adicionados 20 μL de Proteinase K (10mg/mL) e 200 μL do Buffer AL e agitados em agitador tipo vórtex por 15 s. Após dois períodos de incubação a 56°C e 95°C durante 30 e 15 min, respectivamente, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 s. O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 μL de etanol (PA) ao material precipitado e agitado no vórtex por 15 s. A suspensão foi transferida para a coluna de extração com tubo coletor e centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. O líquido transferido

para o tubo coletor foi descartado e o DNA retido na coluna foi reservado. Seguindo a etapa de lavagem, foram adicionados 500 µL de Buffer AW1 à coluna com tubo coletor e centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. O líquido retido no tubo coletor foi descartado e adicionou-se 500 µL do Buffer AW2 à coluna, centrifugando-a 14.000 rpm por 3 min. Finalizando com a etapa de eluição, o tubo coletor com o líquido retido da etapa anterior foi descartado e a coluna com o DNA foi transferida para outro tubo coletor limpo, acrescentando-se 200 µL do Buffer AE. Após incubação a temperatura ambiente por 5 min, a coluna foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. O DNA retido no tubo coletor juntamente com o Buffer AE foi reservado e preservado em freezer a – 20 °C.

9.13 Análise genotípica

Todos os testes moleculares e análise dos resultados obtidos foram realizados em parceria com o Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia da Faculdade da Farmácia da Universidade Federal Fluminense – LEMB-UFF.

9.13.1 Caracterização molecular da espécie

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi utilizada para ratificar a identificação fenotípica da espécie através da amplificação do gene espécie específico Sa442. A identificação deste fragmento de DNA de 108 pb foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Martineau *et al.*1998. Os iniciadores utilizados estão descritos abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores para análise do gene Sa442

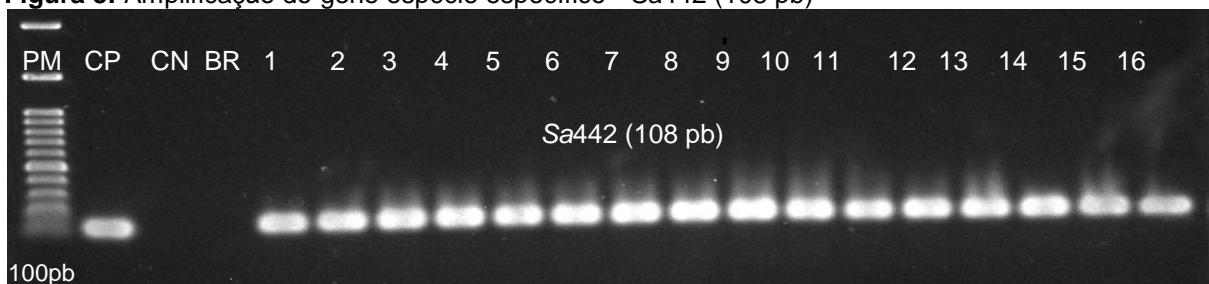
Oligonucleotídeos	Sequência dos Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
Sa442 F	AATCTTTGTCTGGTACACGATATTCTTCACG	108pb
Sa442 R	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA	108pb

9.13.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das amostras de MRSA foi extraído conforme descrito no item 9.11. Em seguida, foram submetidos à reação de PCR para identificação do gene Sa442. A reação de PCR teve um volume final de 25 µL, contendo: 2 µL da suspensão contendo DNA extraído de cada amostra, 2,5 µL tampão de PCR 10X, 1 µL da solução de MgCl₂ a 25mM, 1,5 µL de dNTP a 2mM, 1 µL de cada primer (iniciador): Sa442 F e Sa442 R, 1,5 U de *Taq* DNA Polymerase (invitrogen, São Paulo, Brasil) e H₂O bidestilada estéril q.s.p 25 µL. A mistura da reação foi levada ao termociclador Mastercycler Nexus Gradiente, modelo flexlid (eppendorf®, Germany), sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de: 30 s a 94°C (desnaturação), 1 min a 57°C (hibridização) e 1 min a 72°C (alongamento), seguido de uma etapa de extensão final a 72°C durante 7 min e resfriamento a 4°C. A reação foi padronizada utilizando como controle positivo a cepa *S. aureus* ATCC® 25923, controle negativo a cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 e H₂O MILLI Q como normalizador da reação.

9.13.3 Visualização do material amplificado (gene Sa442)

Após cada reação de PCR, os materiais amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% p/v em solução Tris Borato EDTA (TBE 0,5M) pH 8,0, utilizando-se como padrão o marcador molecular de 100 pb (Amersham Biosciences do Brasil Ltda.). Após a reação, o gel foi corado em solução contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 10 min, e descorado em água durante 30 min. Os géis foram observados e fotodocumentados sob luz U.V. com auxílio do equipamento fotodocumentador L-pix Chemi Aberto (LOCCUS-Cotia-SP-Brasil) (Figura 3).

Figura 3: Amplificação do gene espécie específico - *Sa442* (108 pb)

BR: branco da reação (reagentes); CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-16:MRSA; PM: peso molecular (marcador de tamanho molecular - 100 pb)

9.13.4 Caracterização molecular da resistência à meticilina (*mecA*)

Todas as amostras bacterianas identificadas como MRSA, foram submetidas à PCR para verificar a presença do gene *mecA*. O tamanho esperado do fragmento é de 162 pb e os iniciadores utilizados na reação (MecA P4 e MecA P7), padronizados por Oliveira & De Lencastre, 2002, estão exemplificados na tabela 2

Tabela 2: Iniciadores para análise do gene *mecA*

Oligonucleotídeos	Sequência dos Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
MecA P4	TCCAGATTACA ACTTCACCAGG	162
MecA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	162

9.13.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

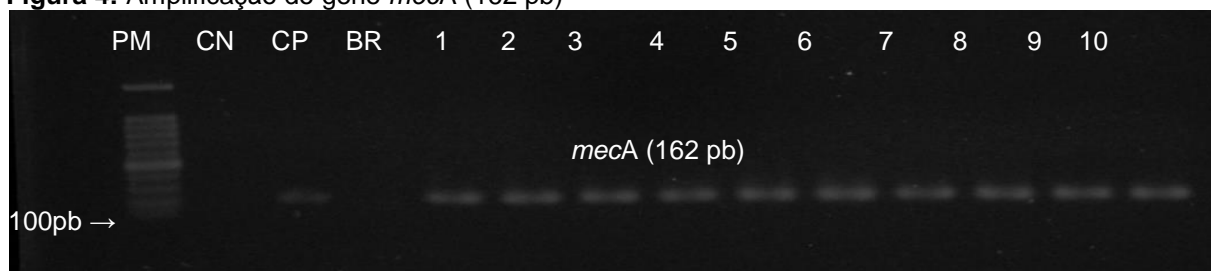
O DNA extraído foi submetido à PCR para identificação do gene *mecA*. A reação de PCR teve um volume final de 25 μ L, contendo: 2 μ L da suspensão contendo DNA extraído de cada amostras, 2,5 μ L tampão de PCR 10X, 1 μ L da solução de $MgCl_2$ a 50mM, 1,5 μ L de dNTP a 2mM, 1 μ L de cada primer (iniciador): MecA P4 e MecA P7 a 10mM, 1,5 U de *Taq* DNA Polymerase (invitrogen, São Paulo, Brasil) e H₂O bidestilada estéril q.s.p 25 μ L. A reação de PCR foi leveda ao termociclador Mastercycler Nexus Gradiente, modelo flexlid (eppendorf®, Germany), sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 s a 55°C (hibridização) e 1 min a 72°C (extensão), seguido de uma etapa de extensão final a 72°C durante 7 min. A

reação foi padronizada utilizando como controle positivo a cepa *S. aureus* ATCC® 29213 (HU25-MRSA-IIIa) , controle negativo a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 e H₂O MILLI Q como normalizador da reação.

9.13.6 Visualização do material amplificado (gene *mecA*)

Após cada reação de PCR, os materiais amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, visualizados e fotodocumentados conforme descrito no item 9.13.3.

Figura 4: Amplificação do gene *mecA* (162 pb)



BR: branco da reação (reagentes); CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-10: Amostras/MRSA; PM: peso molecular (marcador de tamanho molecular - 100 pb).

9.13.7 Detecção do gene de produção da toxina PVL (Leucocidina de Panton-Valentine)

Todas as amostras de MRSA forma submetidos à PCR a fim de detectar a presença dos genes *LukS-PV* e *LukF-PV*, responsáveis pela produção da toxina PVL. Os genes foram coamplificados em uma única reação. Os iniciadores utilizados para a detecção de um fragmento de 463 pb descrito por Lina *et al.* 1999, estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores para análise dos genes que codificam a PVL

Oligonucleotídeos	Sequência dos Iniciadores	Tamanho fragmento (pb)
Luk-PV1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	463pb
Luk-PV2	GCATCAAATGTATTGGATAGCAAAAGC	463pb

9.13.8 Reação em da Polimerase Cadeia (PCR)

O DNA extraído foi submetido à PCR para identificação dos genes da PVL. A PCR teve um volume final de 25 µL, contendo: 2 µL da suspensão contendo DNA extraído de cada amostras, 2,5 µL tampão de PCR 10X, 1 µL da solução de MgCl₂ a 50mM, 1,5 µL de dNTP a 2mM, 1 µL de cada primer (iniciador): LukPV1 e LukPv2 a 1µM, 1,5 U de *Taq* DNA Polymerase (invitrogen, São Paulo, Brasil) e H₂O bidestilada estéril q.s.p 25 µL. A reação de PCR foi leveda ao termociclador Mastercycler Nexus Gradiente, modelo flexlid (Eppendorf®, Germany), sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial a 94 °C durante 2 min; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; extensão final a 72°C durante 5 min. A reação foi padronizada utilizando como negativos a cepa HU25 (MRSA- IIIa-PVL negativo), controle positivo a cepa WB 45 (MRSA-IV-PVL positivo) e H₂O MILLI Q como normalizador da reação.

9.13.9 Visualização do material amplificado (gene PVL)

Após cada reação de PCR, os materiais amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, visualizados e fotodocumentados conforme descrito no item 9.13.3.

Figura 5: Amplificação dos genes da PVL (*LukS* e *LukF* – 463 pb)

BR: branco da reação (reagentes); CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-16: MRSA; PM: peso molecular (marcador de tamanho molecular - 100 pb).

9.13.10 Determinação do perfil clonal pela técnica “*Spa-typing*”

Para determinação do perfil clonal, foi utilizado a metodologia descrita por Shopsin *et al.*, 1999, denominada *Spa-typing*. Os iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento de DNA variando de 350 a 556 pb, estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Iniciadores para análise do *Spa Typing*

Oligonucleotídeos	Sequência dos Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
Spa1095 F	AGACGATCCTTCGGTGAGC	350-556
Spa1517 R	GCTTTTGCAATGTCATTTACTG	350-556

9.13.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

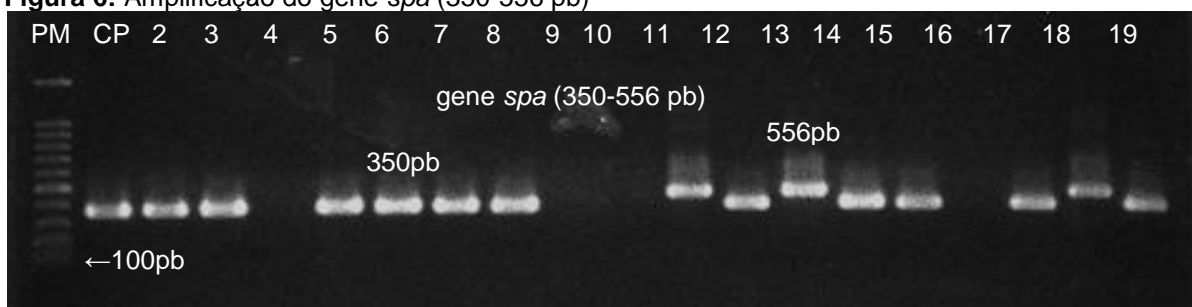
A PCR para identificação do perfil clonal pela técnica de *Spa Typing*, foi realizada tendo um volume final de 25 μ L, contendo: 2 μ L da suspensão contendo DNA extraído de cada amostras, 2,5 μ L tampão de PCR 10X, 2 μ L da solução de $MgCl_2$ a 50mM, 200 μ M de dNTP, 40 nM de cada primer: PA 1095F e PA 1517R, 0,5 U de *Taq* DNA Polymerase (invitrogen, São Paulo, Brasil) e H₂O bidestilada estéril q.s.p 25 μ L. A reação de PCR foi leveda ao termociclador Mastercycler Nexus

Gradiente, modelo flexlid (eppendorf®, Germany), sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, 30 ciclos de 30 s a 95°C (desnaturação), 30 s a 60°C (anelamento) e 45 s a 72°C (alongamento), seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min.

9.13.12 Visualização do material amplificado (Gene *spa*)

Após cada reação de PCR, os materiais amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, visualizados e fotodocumentados conforme descrito no item 9.13.3.

Figura 6: Amplificação do gene *spa* (350-556 pb)



BR: branco da reação (reagentes); CN: controle negativo; CP: controle positivo; 1-16: MRSA; PM: peso molecular (marcador de tamanho molecular - 100 pb).

Nota 1: A eletroforese em gel de agarose foi realizada com o objetivo de verificar a amplificação do gene antes do processo de purificação do material amplificado e posterior sequenciamento.

Nota 2: As amostras com resultado negativo foram repetidas e confirmadas positivas.

9.13.13 Determinação do perfil clonal pela técnica MLST (Multilocus Sequence Typing)

Para a execução do MLST, foram sequenciados sete genes constitutivos que codificam as seguintes enzimas: carbamato quinase (*arcC*), shikimato desidrogenase (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilato quinase (*gmk*), fosfato acetiltransferase (*pta*), triosefosfato isomerase (*tpi*) e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). A metodologia foi realizada segundo Enright et al. 2000, utilizando os iniciadores cujas sequências obtidas na página eletrônica <http://saureus.mlst.net/misc/info.asp> estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Iniciadores para análise do *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Genes alvos	Sequências dos Iniciadores	Tamanho/fragmento (pb)	Produtos
<i>arcC</i>	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456	Carbamato quinase
<i>aroE</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAAATAACGATATC	456	Shikimato desidrogenase
<i>glpF</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465	Glicerol quinase
<i>Gmk</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	417	Guanilato quinase
<i>pta</i>	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	474	Fosfato acetiltransferase
<i>Tpi</i>	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402	Triosefosfato isomerase
<i>yqiL</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516	Acetil coenzima A Acetiltransferase

9.13.14 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das amostras foi extraído como descrito no 9.11. Foram feitas reações para os sete pares de *primers*. A PCR teve um volume final de 25 μ L contendo: 2 μ L da suspensão contendo DNA extraído de cada amostras, 2,5 μ L tampão de PCR 10X, 2 μ L da solução de MgCl₂ a 25mM, 2,5 μ L de dNTP a 2 mM, 1 μ L de cada primer (iniciador), 1,5 U de *Taq* DNA Polymerase (invitrogen, São Paulo, Brasil) e H₂O bidestilada estéril q.s.p 25 μ L. A PCR foi levada ao termociclador Mastercycler Nexus Gradiente, modelo flexlid (eppendorf®, Germany) sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, 30 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 1 min a 57°C (anelamento) e 1 min a 72°C (alongamento), seguido de uma etapa de extensão final a 72°C durante 5 min. As reações da PCR foram realizadas para cada par de iniciadores utilizando-se os mesmos volumes de reagentes e a mesma termociclagem para todos os iniciadores.

9.13.15 Visualização do material amplificado pela técnica de MLST

Após cada reação de PCR, os materiais amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, visualizados e fotodocumentados conforme descrito no item 9.13.3.

Figura 7: Amplificação do gene *yqil* (516 pb)



PM: peso molecular (marcador de tamanho molecular - 100 pb); 1-16: MRSA.

Nota3: A eletroforese em gel de agarose foi realizada com o objetivo de verificar a amplificação do gene antes do processo de purificação do material amplificado e posterior sequenciamento.

9.13.16 Purificação do produto de PCR

Após a realização da PCR para as técnicas de *Spa-typing* e MLST, os produtos foram purificados segundo o protocolo do fabricante do Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega Corporation, Madison, USA). Foi adicionando ao produto amplificado a mesma quantidade (v/v) da solução de ligação de membrana (Membrane Binding Solution). Em seguida, a mistura foi transferida para a coluna de purificação com filtro, incubada por 1 min em temperatura ambiente e centrifugada 14.000 rpm por 1 min. Após centrifugação, foram adicionados 700µL da solução de lavagem (Membrane Wash Solution) à coluna de purificação e centrifugada a 14.000 rpm durante 1 minuto. O filtrado foi descartado e repetido a etapa de lavagem adicionando 500 µL da solução de lavagem, centrifugando-a por 5 min a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna foi centrifugada por 1 min a 14000 rpm. A coluna de purificação contendo o DNA adsorvido ao filtro foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionados 50 µL de água livre de nuclease. Após incubação por 1 min em temperatura ambiente e centrifugado a 14.000 rpm por 1 min, coluna de purificação foi descartada e o filtrado retido no microtubo contendo o DNA purificado, foi conservado -20°C e posteriormente encaminhado para sequenciamento na

Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz-IOC-Fiocruz e Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

9.14 Definição de colonização comunitária e hospitalar

Pacientes identificados com colonização em período $\leq 48h$ após a internação, foram considerados com colonização adquirida na comunidade. Entre os pacientes com colonização adquirida no ambiente hospitalar, o status de colonizado foi identificado após 48h de internação (CDC, 2013).

9.15 Cálculo da prevalência global de colonização por MRSA

A prevalência global de colonização foi obtida dividindo o total de pacientes colonizados pelo total de pacientes internados, com intervalo de confiança IC de 95%.

$$Prevalência(colonização) = \frac{\text{número de pacientes colonizados}}{\text{total de pacientes internados}}$$

9.16 Cálculo da incidência de colonização por MRSA

O coeficiente de incidência de colonização foi calculado dividindo o total pacientes identificados com colonização adquirida no ambiente hospitalar ($>48h$ após a internação) pelo total de pacientes internados no período, menos o total de pacientes com colonização comunitária ($\leq 48h$ após a internação), com IC de 95%.

$$Incidência(colonização) = \frac{\text{pacientes com colonização após 48h de internação}}{\text{total de pacientes que não apresentaram colonização no momento da internação}}$$

9.17 Cálculo da prevalência global de infecção por MRSA

A prevalência global de infecção foi calculada dividindo o total de pacientes HIV positivos identificados com processo(s) infeccioso(s), pelo total de pacientes internados no período, com IC de 95%.

$$\text{Prevalência (MRSA)} = \frac{\text{pacientes com infecção}}{\text{total de pacientes internados}}$$

9.18 Cálculo da prevalência de infecção por MRSA entre os pacientes colonizados

A prevalência de infecção entre os pacientes colonizados foi obtida dividindo o total de pacientes colonizados que desenvolveram processo(s) infeccioso(s), dividido pelo total de pacientes colonizados, com IC de 95%.

$$\text{Prevalência (Infecção|colonizados)} = \frac{\text{pacientes colonizados que desenvolveram infecção}}{\text{total de pacientes colonizados}}$$

9.19 Cálculo da incidência de infecção por MRSA

O coeficiente de incidência de infecção foi calculado dividindo o total pacientes identificados com infecção adquirida no ambiente hospitalar (>48h após a internação) pelo total de pacientes internados no período, menos o total de pacientes com infecção comunitária (≤48 após a internação), com IC de 95%.

$$\text{Incidência (infecção por MRSA)} = \frac{\text{pacientes com infecção após 48h de internação}}{\text{total de pacientes que não apresentaram colonização no momento da internação}}$$

9.20 Cálculo do tempo médio de internação entre os pacientes colonizados que desenvolveram processo infeccioso

O cálculo do tempo médio de internação foi calculado dividindo o somatório do(s) período(s) de internação de cada paciente colonizado que desenvolveu processo infeccioso, pelo total de pacientes colonizados e identificados com processo infeccioso.

Nota 4: Foram consideradas as reinternações ocorridas em períodos inferiores a um ano após a última data de isolamento do MRSA.

Nota 5: Foram considerados os pacientes colonizados que receberam alta médica e retornaram ao ambulatório apresentando processo infeccioso, sendo contabilizando o período em que permaneceram internados.

9.21 Dados clínicos e epidemiológicos

Esse estudo utilizou-se da base de dados clínicos da coorte de pacientes HIV do INI. Todas as informações foram obtidas por meio da análise dos prontuários eletrônicos desses pacientes, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética. Foram coletados os seguintes dados: idade, sexo, data da internação, data da coleta do “swab” nasal e/ou espécime clínico em que foi isolado o MRSA, data da alta médica, data e causa de óbito, internação nos últimos 12 meses anteriores a data de isolamento do MRSA, comorbidades, contagem de CD4 e carga viral (período considerado entre seis meses antes e um mês após em relação a data de isolamento do MRSA).

9.22 Definição de comorbidades

No presente estudo, foram consideradas comorbidades as doenças crônicas que se apresentam com maior prevalência na população geral.

9.23 Análise estatística

Os dados obtidos foram compilados no software Microsoft Excel e analisados utilizando o programa de análises estatísticas R (www.r-project.org). As variáveis categóricas foram analisadas utilizando os testes não paramétricos Qui-quadrado de Pearson e Wilcoxon. A razão de chance para morte foi calculada usando regressão

logística e intervalo de confiança com 95%. Foi considerado o nível de significância de 5%.

11 RESULTADOS

Entre janeiro de 2010 e dezembro de 2015, foram admitidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-INI-Fiocruz 843 pacientes HIV positivos. Deste total, 764 (91%) pacientes foram submetidos à coleta de “swab” nasal, sendo 513 (67%) do sexo masculino e 251 (33%) do sexo feminino. Setenta e nove pacientes (9%) não tiveram seus “swabs” coletados. Dentre estes, 60 não tiveram seus “swabs” coletados por falha no protocolo, 15 devido ao óbito, dois por evasão, um por motivo de transferência e um por ter recebido alta.

Foram identificados 93 (12%) pacientes portadores de MRSA na cavidade nasal, sendo 50 (54%) indivíduos com colonização adquirida no ambiente hospitalar e 43 (46%) com colonização adquirida na comunidade.

O Programa de Busca Ativa (BA) foi responsável pela identificação dos 50 (54%) pacientes que adquiriram colonização hospitalar, totalizando 90 (65,7%) amostras. Os “swabs” coletados na admissão (ADM) pela equipe de saúde identificaram os 43 (46%) pacientes colonizados na comunidade, totalizando 47 (34,3%) amostras de MRSA.

Dentre os pacientes colonizados, 62 (66%) eram do sexo masculino e 31 (34%) do sexo feminino, com mediana de idade igual a 40 anos (IQR: 33 – 48; $p=0,8$). Quanto aos pacientes com colonização comunitária, 25 (58%) eram homens e 18 (42%) mulheres, apresentando uma mediana de idade igual a 38 anos (IQR: 31,8 – 43,2; $p=0,3$). Em relação àqueles que adquiriram colonização nosocomial, a mediana de idade foi de 41,5 anos (IQR: 35 – 51; $p=0,2$), sendo 38 (76%) do sexo masculino e 12 (24%) do sexo feminino.

Desse total, 76 (82%) pacientes apresentaram apenas colonização nasal (109 amostras), ao passo que em 17 (18%) pacientes foram obtidas 51 amostras, sendo 28 (55%) de “swab” nasal e 23 (45%) de diferentes fontes de infecções ou adquiridas após a internação e hemocultura. Entre os 671 pacientes com “swabs” negativos, foram obtidas 12 amostras em 10 (1,5%) pacientes (sete homens e três mulheres), todos provenientes de sítios com processo infeccioso e hemocultura. Entre os 27 pacientes acometidos por infecção, a mediana de idade foi de 40 anos (IQR: 32,5 – 50,5; $p=0,7$), sendo 22 (81%) pacientes do sexo masculino e cinco (19%) pacientes do sexo feminino.

No total, foram analisadas 172 amostras de MRSA obtidas de 103 pacientes HIV positivos internados no INI no período considerado (Tabela 6).

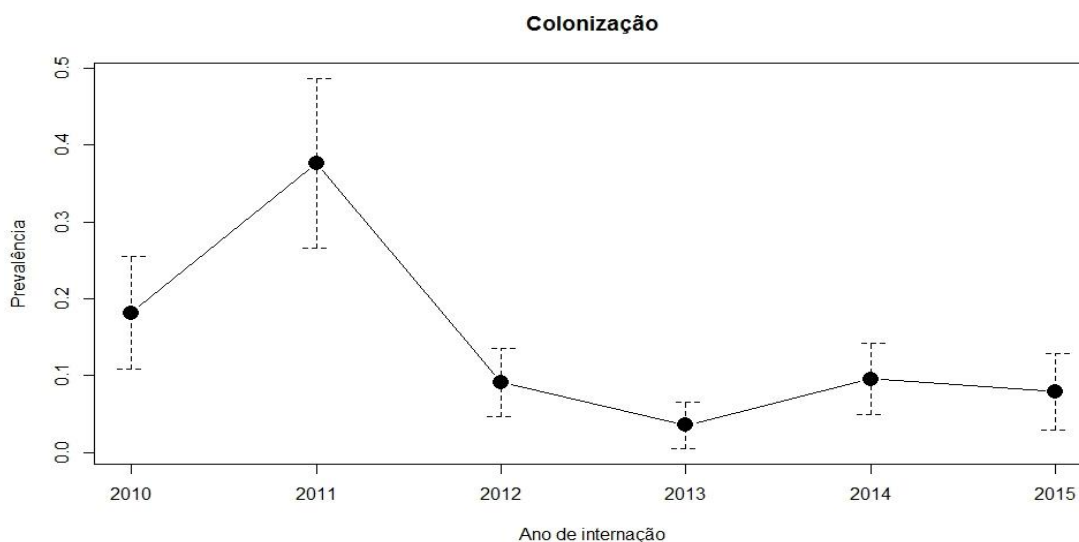
Tabela 6: Total de pacientes colonizados e/ou infectados por MRSA internados no INI-Fiocruz entre 2010 e 2015 e N/Amostras

Colonização	Infecção	N/Pacientes	N/Amostras
Positivo	Negativo	76 (74%)	109 (63%)
Positivo	Positivo	17 (16,5%)	51 (30%)
Negativo	Positivo	10 (9,5%)	12 (7%)
-	-	$\Sigma = 103$ (100%)	$\Sigma = 172$ (100%)

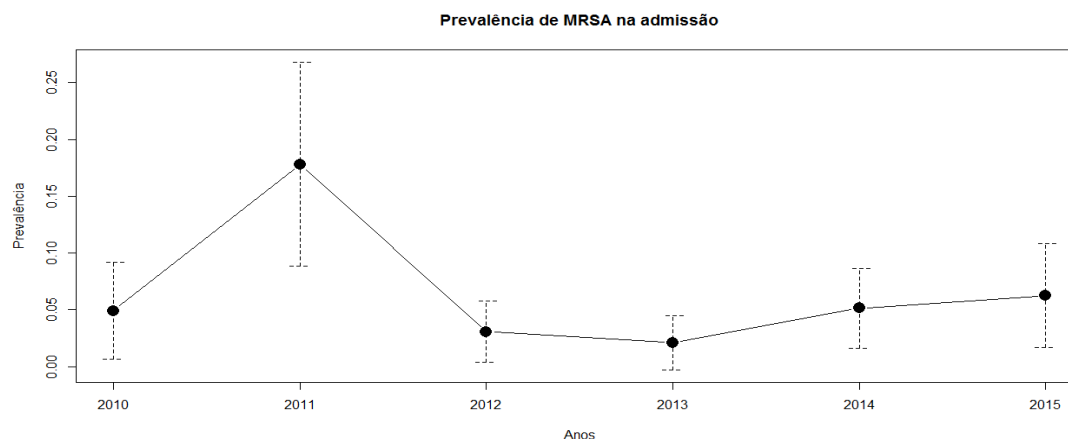
Σ : Somatório

A prevalência global de colonização nasal por MRSA entre os pacientes HIV positivos internados foi de 12,2% (IC 95%: 9,8 – 14,5) variando ao longo dos anos (Figura 8).

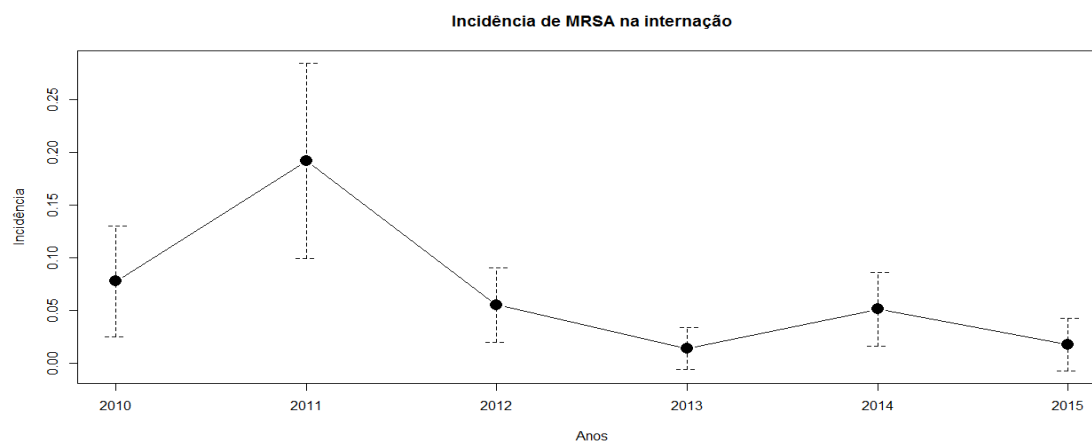
Figura 8: Prevalência global de colonização nasal por MRSA entre os pacientes HIV positivos internados no INI-Fiocruz no período entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015



A prevalência de colonização na admissão, ou seja, relacionada à comunidade, foi de 5,8 % (IC 95%: 4,1 – 7,4), variando ao longo dos anos (Figura 9).

Figura 9: Prevalência de colonização associada à comunidade ($\leq 48h$ após a internação)

O coeficiente de incidência de colonização adquirida no ambiente hospitalar foi de 6,6 % (IC 95%: 4,8 – 8,3), variando ao longo dos anos (Figura 10).

Figura 10: Incidência de colonização associada aos cuidados com a saúde ($>48h$ após a internação)

A prevalência global de infecção por MRSA foi de 3,5% (IC 95%: 2,2 – 4,8). Analisando somente os pacientes colonizados que, em algum momento, desenvolveram processo infeccioso, essa taxa sobe para 18,3% (IC 95%: 10,3 – 26,3). Entre estes, as datas das internações, a identificação dos processos de colonização e infecção, bem como o tempo de permanência no hospital, foram apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Pacientes colonizados e infectados. Correlação entre as datas de internação, colonização, processo infeccioso e o tempo de permanência no hospital

Paciente	Internação (dt)	Colonização (d)	Infeção (d)	Internação (d)	Espécime clínico/ infecção	MIC/vanco (µg/mL)
INI-CI710A	06/07/2010	≤48h (2)	≤48 (2)	3	SF	1,0
INI-CI511C	25/05/2011	≤48h (1)	>48h (160)	165	SA	1,0
INI-CI1212	11/12/2012	≤48h (1)	≤48h (1)	2	SF	1,0
INI-CI414A	07/04/2014	≤48h (1)	≤48h (1)	7	SA	1,0
INI-CI1113 (*)	31/01/2013	≤48h (1)	(-)	1	(-)	1,0
INI-CI1113 (*)	(NI)	(-)	(18)	(NI)	SF	1,0
INI-CI414B (*)	11/04/2014	≤48h (1)	(-)	4	(-)	1,0
INI-CI414B (*)	(NI)	(-)	(423)	(NI)	SA	1,0
INI-CI1115	13/01/2015	≤48h (1)	>48h (34)	54	SG	1,0
INI-CI713	12/07/2013	≤48h (2)	(-)	12	(-)	1,0
INI-CI713	27/07/2013	>48h (24; 40)	>48h (43)	52	SG	1,0
INI-CI1110	02/01/2010	>48h (6; 16)	≤48h (2)	19	AT	1,0
INI-CI510	13/05/2010	>48h (88; 108)	>48h (76; 112)	138	LBA; SO	1,0
INI-CI511B (*)	14/05/2011	>48h (10)	(-)	20	(-)	1,0
INI-CI511B (*)	01/08/2011	(-)	≤48h (3)	33	SG	1,0
INI-CI610	08/06/2010	>48h (27)	>48h (27)	49	LBA	0,5
INI-CI611 (*)	17/06/2011	>48h (17)	(-)	21	(-)	1,0
INI-CI611 (*)	(NI)	(-)	(198)	(NI)	BP	1,0
INI-CI710B	20/07/2010	>48h (41; 61)	>48h (44; 56)	73	SG; PtC	1,0
INI-CI910	10/09/2010	>48h (45)	>48h (20; 25)	67	PtC; SG	1,0
INI-CI910	24/11/2010	≤48h (1)	>48h (11)	15	SG	1,0
INI-CI910	12/05/2011	>48h (12)	>48h (26; 27)	30	SG; PtC	1,0
INI-CI511A	06/05/2011	>48h (4;14;28;41;60)	>48h (10)	84	LBA	1,0
INI-CI1214	01/12/2014	>48h (18)	>48h (25)	36	SG	1,0
Σ=17pacientes	-	Σ=28 isolados	Σ=23 isolados	-	-	

AT: Aspirado traqueal; BP: Biópsia de pele; LBA: Lavado broncoalveolar; NI: Não internou; PtC: Ponta de cateter; SA: Secreção de abscesso; SF: Secreção de ferida; SG: Sangue; "SN: Swab" nasal; SO: Secreção ocular;

dt: data;

d: dias;

(*): Pacientes identificados com colonização durante a internação e que retornaram ao ambulatório com processo infeccioso após ter recebido alta;

(-): Não foi identificado colonização ou infecção.

O coeficiente de incidência de infecção nosocomial foi de 1,3% (IC 95%: 0,7 – 1,9). O tempo médio de internação foi de 52 dias para os pacientes colonizados que desenvolveram processo infeccioso. Este período aumentou para 65 dias entre os pacientes que adquiriram colonização no ambiente hospitalar, os quais se apresentaram colonizados 28 dias em média após a internação. Entre os pacientes com colonização comunitária, o tempo médio de internação foi de 37,5 dias.

Entre os 10 pacientes acometidos apenas por processo infeccioso, não apresentando “swab” nasal positivo para MRSA, aqueles indentificados com infecção nosocomial, tiveram um tempo médio de 50 dias para o desenvolvimento de infecção e um período médio de internação de 56 dias, diminuindo para 16 dias, em média, o período de internação entre os pacientes identificados com processo infeccioso adquirido na comunidade (Tabela 8).

Tabela 8: Pacientes que apresentaram somente infecção por MRSA. Correlação entre as datas da internação, processo infeccioso e tempo de permanência no hospital

Paciente	Internação (dt)	Infecção (d)	Internação (d)	Espécime clínico
INI-I811	23/08/2011	>48h (24)	31	AT
INI-I1011	10/10/2011	>48h (9)	44	AT
INI-I213	27/02/2013	≤48h (1)	38	SA; AS
INI-I614	13/06/2014	≤48h (1)	4	AS
INI-I1214A	04/12/2014	>48h (8)	69	AT
INI-I1214B	08/12/2014	≤48h (1)	18	LP
INI-I115	15/01/2015	>48h (75)	75	SG
INI-I215	14/02/2015	>48h (136)	138	AT
INI-I515	14/05/2015	≤48h (1)	11	SA
INI-I915	20/09/2015	≤48h (1)	9	SA; SG
Σ=10 pacientes	-	-	-	Σ=12 isolados

AT: Aspirado traqueal; d: dias; dt: data; LP: Líquido pleural; SA: Secreção de abscesso; SG: Sangue.

As causas da morte foram categorizadas de acordo com o Protocolo CoDe (Codificação de causas de morte em pacientes HIV). Observando o total de pacientes (103) identificados com colonização nasal e/ou infecção por MRSA, 42 (40,7%) foram a óbito no período do estudo. Entre estes, 17 (40,5%) pacientes morreram por choque séptico ou outras causas relacionadas a infecções bacterianas, sendo que em nove (21,4%) destes foram identificados MRSA em sítios de infecção e hemocultura.

Três pacientes (7%) morreram por causas diretamente relacionadas às infecções por MRSA. Um paciente por choque cardiogênico, outro por pneumonia e outro por tromboembolismo venoso tiveram MRSA identificados no sangue e ponta de cateter, aspirado traqueal e sangue, respectivamente, no mesmo período relacionado às causas de óbito, com três dias em média entre a identificação do processo infeccioso e a data de óbito. Em quatro pacientes, as infecções por MRSA foram identificadas em média 15 dias antes em relação à data de óbito. Em outros dois

pacientes com causa de óbito por sepse, as infecções por MRSA foram identificadas em período superior a seis meses antes da data de óbito (Tabela 9).

Tabela 9: Pacientes colonizados e/ou infectados por MRSA que foram a óbito no período do estudo

Pacientes	dt/Internação	dt/Infecção	Espécime clínico	dt/Óbito	Causa/Óbito
INI-CI110 (**)	02/01/2010	04/01/2010	AT	21/01/2010	Choque séptico
INI-CI710B (**)	20/07/2010	16/09/2010	SG, PtC	01/10/2010	Choque séptico refratário/Stafilo.
INI-CI910A (**)	10/09/2010	06/06/2011	SG, PtC	11/06/2011	Choque cardiogênico
INI-C910A (*)	16/09/2010	(-)	(-)	21/10/2010	Choque séptico/TB disseminada
INI-C910B (*)	23/09/2010	(-)	(-)	01/12/2011	Sepse pulmonar
INI-C1010 (*)	25/10/2010	(-)	(-)	06/03/2011	Choque séptico
INI-C511 (*)	06/05/2011	(-)	(-)	13/03/2012	Choque séptico/TBP
INI-CI611 (**)	17/06/2011	10/02/2012	BP	27/09/2014	Sepse nosocomial (foco)
INI-C611 (*)	18/06/2011	(-)	(-)	03/08/2011	Outras infecções bacterianas
INI-C711 (*)	01/07/2011	(-)	(-)	19/07/2011	Outras infecções bacterianas
INI-C911(*)	16/09/2011	(-)	(-)	04/11/2012	Choque séptico
INI-C312 (*)	08/03/2012	(-)	(-)	18/04/2012	Choque séptico refratário
INI-C512(*)	18/05/2012	(-)	(-)	11/08/2013	Choque séptico /TBP
INI-C912 (*)	06/09/2012	(-)	(-)	24/12/2012	Choque séptico
INI-CI713(**)	12/07/2013	09/09/2013	SG	18/09/2013	Choque séptico associado/cateter
INI-I1214B(NC)	08/12/2014	08/12/2014	LP	23/06/2015	Choque séptico
INI-CI115 (**)	13/01/2015	16/02/2015	SG	07/03/2015	Choque séptico
INI-I115 (NC)	15/01/2015	30/03/2015	SG	30/03/2015	Tromboembolismo venoso
INI-I215 (NC)	14/02/2015	29/06/2015	AT	01/07/2015	Pneumonia
INI-C515 (*)	08/05/2015	(-)	(-)	09/05/2015	Choque séptico

AT: Aspirado traqueal; AVC: Acidente vascular cerebral; BP: Biópsia de pele; LP: Líquido pleural; PtC: Ponta de cateter; SA: Secreção de abscesso; SG: Sangue; TB: Tuberculose; TBP: Tuberculose pulmonar;

dt: Data;

(-): Pacientes sem infecção por MRSA;

(NC): Pacientes não colonizados;

(*): Pacientes somente colonizados;

(**): Pacientes colonizados e infectados.

Após análise por regressão logística, foi observado que os pacientes identificados com processo infeccioso por MRSA, apresentaram 35,5 vezes mais chance de ir a óbito (OR=35,5; IC95%: 15,3 – 85,5) comparados àqueles que não desenvolveram infecção. Analisando os pacientes colonizados, a possibilidade de ir a óbito se apresentou 65,5 vezes maior (OR = 65,5; IC95%: 29,6 – 166,6) em relação aos não colonizados.

Pacientes com histórico de hospitalização prévia nos últimos 12 meses anteriores à data da coleta do “swab” nasal em que foi identificado o processo de

colonização por MRSA, apresentaram cinco vezes mais chance de se tornarem colonizados (OR = 5; IQR 1.5 - 17.8; $p = 0.005$).

Dados sobre as comorbidades (doenças crônicas) prevalentes nesta população foram obtidos e analisados a fim de verificar possíveis correlações com o processo de colonização (Tabela 10).

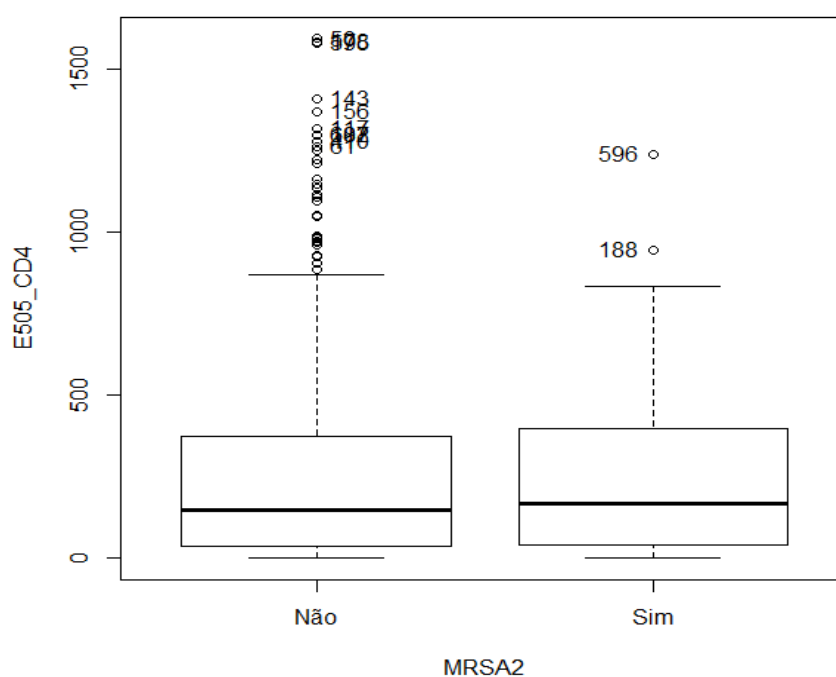
Tabela 10: Análise das principais comorbidades como fator de risco para colonização

Comorbidades	MRSA (+)	MRSA (-)	p-valor
Depressão	24 (15.4%)	132 (84.6%)	0.65
IRC	5 (31.2%)	11 (68.8%)	0.05
SD MTB	57 (14.0%)	351 (86.0%)	0.86
Diabetes	10 (10.5%)	85 (89.5%)	0.3
Hepatite B	5 (38.5%)	8 (61.5%)	0.01
Hepatite C	1 (8.3%)	11 (91.7%)	0.5
HA	9 (9.4%)	87 (90.6%)	0.16

HA: Hipertensão arterial; IRC: Insuficiência renal crônica; SD MTD: Síndromes metabólicas (Dislipidemia; hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia)

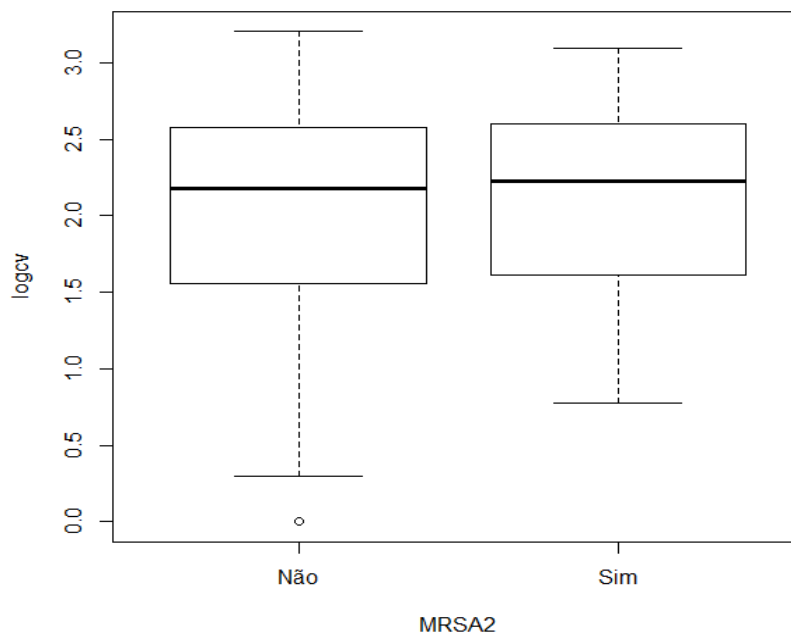
A contagem de CD4 para o grupo de estudo apresentou uma mediana de 273,5 células/mm³ (IQR 168 - 397.0 células/mm³; $p = 0.3$) (Figura 11).

Figura 11: Análise da contagem de CD4 como fator de risco para colonização



A mediana do log da carga viral (logcv) foi de 0.986 cópias/mL (IQR 2.225 - 2.598 cópias/mL; $p = 0.5$) (Figura 12).

Figura 12: Análise da quantificação da carga viral (logcv) como fator de risco para colonização



Pela análise da contagem de células CD4 e da quantificação da carga viral observados no grupo de estudo, os valores de p obtidos iguais a 0,3 e 0,5, respectivamente, não apresentaram significância estatística. Porém, análises feitas separadamente entre os pacientes com colonização hospitalar e comunitária demonstraram valores de p iguais a 0,006 (mediana: 86,5; IQR: 49 – 37775,5) e 0,005 (mediana: 32702; IQR: 79,5 – 143800,5) respectivamente, para a quantificação da carga viral. Os valores de p para a contagem de CD4 foram 0,3 (mediana: 144; IQR: 62 – 252) para os pacientes com colonização hospitalar e, 0,4 (mediana: 229; IQR: 31 – 487) para os pacientes com colonização comunitária.

As amostras obtidas de sítios de infecção foram testadas quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco-difusão, bem como a determinação da concentração inibitória mínima para a vancomicina pelo método da microdiluição em caldo (Tabela 11).

Tabela 11: Fenótipo de resistência aos antimicrobianos e perfil clonal das amostras identificadas em sítios de infecção e hemocultura

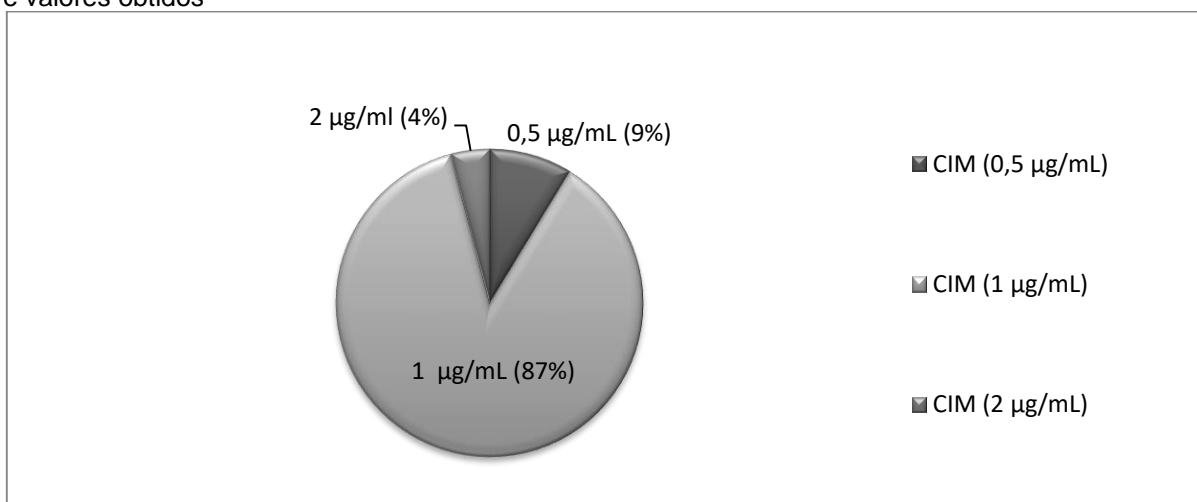
Paciente	Local	Espécime clínico	Spa-type/MLST	Fenótipo de resistência	MIC/Vanco (µg/mL)
INI-CI110	ENF	AT (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN (I), LEV (I), OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-CI610	ENF	LBA (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN (I), LEV, OXA, P, RD, SXT	0,5
INI-CI510	ENF	LBA (i), SO (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV (I), OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-CI710B	ENF	SG (i), PtC (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-CI910	ENF	SG (iii), PtC (ii)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-CI511A	ENF	LBA (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-CI511B	ENF	SG (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-CI511C	ENF	SF (i)	t318/ST30	AMP, AMC, KF, OXA, P	1,0
INI-CI710A	AMB	SF (i)	t318/ST30	AMP, AMC, KF, OXA, P	1,0
INI-CI611	AMB	BP (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P, RD, SXT	1,0
INI-I811	ENF	AT (i)	t002/ST5	CIP, DA, ERI, CN, OXA, P	1,0
INI-I1011	ENF	AT (i)	AKEEEMBKMO/N T	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P	1,0
INI-CI1212	AMB	SF (i)	t318/ST30	AMP, KF, OXA, P	1,0
INI-CI113	AMB	SF (i)	t318/ST30	AMP, AMC, KF, ERI, OXA, P, RD	1,0
INI-I213	AMB	SA (ii)	t318/ST30	AMP, AMC, KF, OXA, P	1,0
INI-CI713	ENF	SG (i)	t318/ST30	CIP, OXA, P	1,0
INI-CI414A	AMB	AS (i)	t318/ST30	OXA, P	1,0
INI-CI414B	AMB	SA (i)	t318/ST30	OXA, P	1,0
INI-I614	ENF	SA (i)	t318/ST30	OXA, P	1,0
INI-I215	ENF	AT (i)	t1094/ST5	CIP, DA, ERI, CN, OXA, P	1,0
INI-I1214B	ENF	LP (i)	GKQKAOMQ/NT	ERI, OXA, P, RD	1,0
INI-I1214A	ENF	AT (i)	GKQKAOMQ/NT	ERI, OXA, P, SXT	1,0
INI-CI1214	ENF	SG (i)	t1094/ST5	CIP, DA, ERI, OXA, P, RD	1,0
INI-CI115	ENF	SG (i)	t037/ST239	CIP, DA, ERI, CN, OXA, P, RD, SXT, TE	1,0
INI-I115	ENF	SG (i)	t318/ST30	OXA, P	1,0
INI-I515	AMB	SA (i)	t1094/ST5	CIP, DA, ERI, OXA, P, RD	1,0
INI-I915	AMB	SA (i); SG (i)	t037/ST239	AMP, AMC, KF, CIP, DA, ERI, CN, LEV, OXA, P, RD, SXT	1,0
Σ=27 pacientes	-	Σ=35 isolados	-	-	-

AMP (Ampicilina); AMC (Amoxicilina-Clavulanato); AT: Aspirado traqueal; BP: Biópsia de pele; CIP (Ciprofloxacina); CN (Gentamicina); DA (Clindamicina); ERI (Eritromicina); KF (Cefalotina); LBA: Lavado broncoalveolar; LEV (Levofloxacina); LP: Líquido pleural; NT: Não tipável; SA: Secreção de abscesso; SF: Secreção de ferida; SG: Sangue; SO: Secreção ocular; OXA (Oxacilina); P (Penicilina); RD (Rifampicina); SXT (Sulfametoxazol-Trimetoprima); TE (Tetraciclina); (i): isolado único por espécime clínico; (ii): dois isolados por espécime clínico; (iii): três isolados por espécime clínico.

Além dos beta-lactâmicos, os t037/ST239 apresentaram resistência à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, levofloxacina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima, sendo uma amostra resistente a tetraciclina. Aqueles caracterizados como t310/ST30 apresentaram basicamente resistência à oxacilina e penicilina, sendo uma amostra resistente a ciprofloxacina e outra resistente a eritromicina e rifampicina. Os clones t002/ST5 e t1094/ST5 apresentaram resistência a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e rifampicina, sendo uma amostra resistente também a gentamicina. As amostras sem definição do tipo de *spa* e MLST (GKQKAOMQ/NT) foram resistentes a eritromicina, sendo uma delas resistente a rifampicina e outra a sulfametoxazol-trimetoprima. A única amostra (AKEEEMBKMO/NT), também sem definição do tipo de *spa* e MLST, apresentou resistência a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina e levofloxacina.

Seguindo as orientações do CLSI 2015, todas as amostras de MRSA (colonização e infecção) foram testadas quanto ao perfil de sensibilidade à vancomicina pela técnica da microdiluição em caldo. Os resultados da CIM para vancomicina estão dentro do valor de sensibilidade variando de 0,5 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13).

Figura 13: Concentração inibitória mínima para a vancomicina pelo método da microdiluição em caldo e valores obtidos



A fim de confirmar os resultados obtidos nos testes fenotípicos para a caracterização da espécie e resistência à metilina, os genes *Sa442* e *mecA*,

respectivamente, foram detectados em todas as amostras. Todas as amostras foram investigadas quanto à presença dos genes *LukS-PV* e *LukF-PV* responsáveis pela codificação da toxina PVL e os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Resultado dos testes moleculares para os genes *Sa442*, *mecA*, *lukS-PV* e *lukF-PV*

Linhagem clonal: MLST(ST)/ spa-type(t)	Nº/amostras	Resultados da PCR		
		<i>Sa442</i>	<i>mecA</i>	PVL(+),(-)
ST1/t127 (UJFKBPE)	4	+	+	-
ST5/t1094 (JMBDMGMK)	35	+	+	-
ST5/t002 (TJMBDMGMK)	1	+	+	-
ST30/t318 (WGKKAKAOMQ)	54	+	+	+(48)/-(6)
ST239/ t037 (WGKAOMQ)	67	+	+	+(9)/-(58)
NT/t2032 (HGFMBQBLO)	6	+	+	+
NT/t5179 (TJGKBPE)	2	+	+	+
NT/(GKQKAOMQ)	2	+	+	+
NT/(AKEEEMBKMO)	1	+	+	-

NT: Não tipável; (-): Resultado negativo para a presença do gene; (+): Resultado positivo para a presença do gene.

Os resultados para pesquisa dos genes da PVL foram positivos para os clones ST30 (89%), ST239 (13,5%), t2032 (100%), t5179 (100%) e NT/NT (GKQKAOMQ) (100%). As nove amostras de ST239 PVL positivo foram identificadas em sete pacientes, sendo que cinco deles apresentaram somente colonização, um com colonização e infecção (hemocultura) e outro apenas com processo infeccioso (secreção de abscesso e hemocultura). Após sequenciamento do gene da proteína A (*Spa-typing*), as sequências (t) obtidas foram confirmadas com os padrões de sequências (ST) definidas pela metodologia MLST. Foram encontradas as seguintes correlações: t127 (ST1), t1094 (ST5), t002(ST5), t318 (ST30), t037 (ST239), t2032 (sem correlação ST), t5179 (sem correlação ST). Duas amostras com a sequência “GKQKAOMQ” e uma com a sequência “AKEEEMBKMO” obtida na análise inicial por *spa-typing* não apresentaram padrão de leitura pelo MLST (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados dos sequenciamentos obtidos pela técnica *spa-typing* e MLST

<i>spa-typing</i>	Sequências (24pb)	MLST	Nº/amostras	Nº/pacientes
t127	UJFKBPE	ST1	4 (2.3%)	4 (3.7%)
t1094	JMBMDMGMK	ST5	35 (20.3 %)	24 (22.3%)
t002	TJMBMDMGMK	ST5	1 (0.6)	1 (0.9%)
t318	WGKKAKAOMQ	ST30	54 (31.3%)	39 (36.2%)
t037	WGKAOMQ	ST239	67 (39%)	30 (27.8%)
t2032	HGFMBQBLO	NT	6 (3.5%)	5 (4.6%)
t5179	TJGKBPE	NT	2 (1.2%)	2 (1.8%)
NT	GKQKAOMQ	NT	2 (1.2%)	2 (1.8%)
NT	AKEEEMBKMO	NT	1 (0.6%)	1 (0.9%)
-	-	-	$\Sigma = 172$	$\Sigma = 108 [103 + 5(*)]$

pb: Pares de bases; NT: Não tipável.

Nota7: () três clones distintos foram isolados em um único paciente; em três pacientes foram isolados dois clones distintos, totalizando cinco MRSA a mais na soma total de isolados (103 pacientes + 5 isolados de 4 pacientes com mais de um clone).*

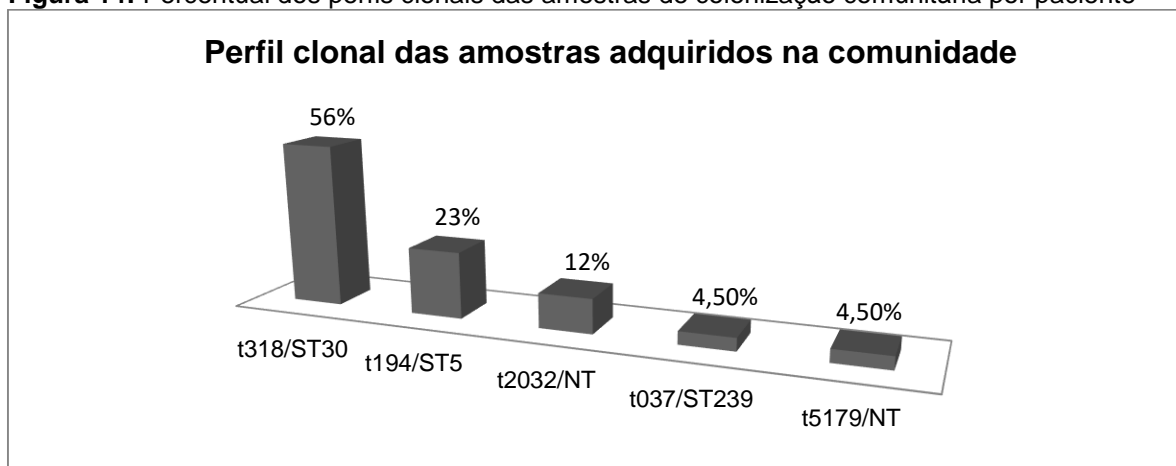
Entre os pacientes que apresentaram apenas colonização nasal, em 73 (96%) deles foi isolado somente um clone (Tabela 14). Em outros três pacientes (4%) foram isolados mais de um clone (Tabela 17).

Tabela 14: Perfil clonal das amostras nasais identificados de pacientes com um único tipo clonal

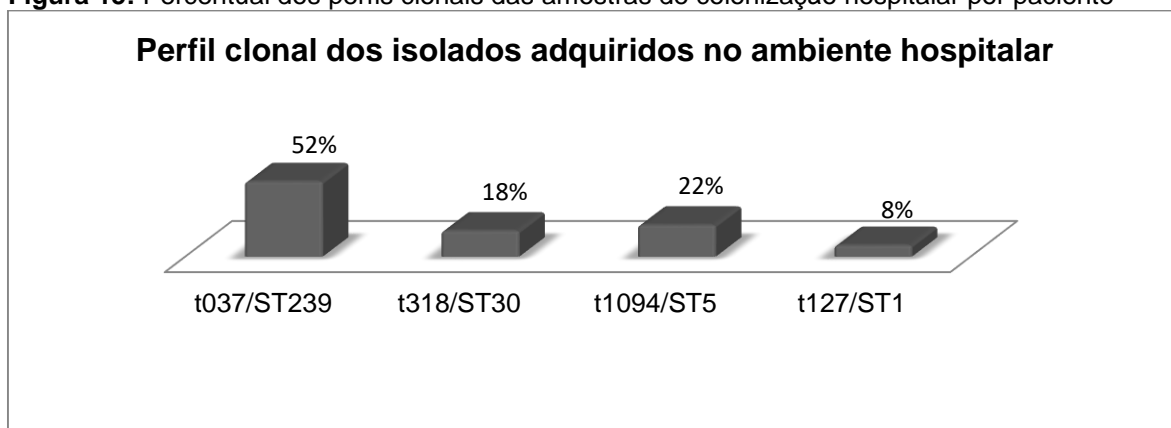
<i>spa-type/MLST</i>	Nº/amostras	Nº/pacientes
t127/ST1	3 (2.9%)	3 (4.1%)
t1094/ST5	26 (25.9%)	17 (23.3%)
t318/ST30	32 (31.7%)	26 (35.6%)
t037/ST239	33 (32.8%)	21 (28.8%)
t2032/NT	6 (5.9%)	5 (6.8%)
t5179/NT	1 (0.9%)	1 (1.4%)
-	$\Sigma = 101 (100\%)$	$\Sigma = 73 (96\%)$

NT: Não tipável

O perfil clonal de todas as amostras identificadas em processo de colonização associada à comunidade e aos cuidados em saúde, além dos respectivos percentuais, estão expostos nas figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14: Percentual dos perfis clonais das amostras de colonização comunitária por paciente

NT: Não tipável por MLST

Figura 15: Percentual dos perfis clonais das amostras de colonização hospitalar por paciente

Foi observado em 16 pacientes (94%) colonizados e infectados que, as linhagens identificadas causando processo infeccioso, foram as mesmas identificadas na coleta de swab nasal (Tabela 15). Somente em um paciente (6%), a cepa identificada no processo de colonização foi diferente daquela que causou infecção (Tabela 17).

Tabela 15: Perfil clonal dos MRSA identificados em pacientes colonizados e infectados por um único clone e espécime clínico

spa-type, MLST	N/amostras	N/Pacientes	N/amostras nasais	N/amostras por espécime clínico
t1094/ST5	2(4,3%)	1(6,3%)	1	SG(1)
t318/ST30	12(25,5%)	6(37,5%)	6	SA(2)/SF(4)
t037/ST239	34(72,2%)	9(56,2%)	18	AT(1)/BP(1)/LBA(3) SG(6)/SO(1)/PtC(3)
-	$\Sigma= 47$ amostras	$\Sigma= 16$ pacientes	$\Sigma= 25$ amostras	$\Sigma= 22$ amostras

AT: Aspirado traqueal; BP: Biópsia de pele; LBA: Lavado broncoalveolar; PtC: Ponta de cateter; SA: Secreção de abscesso; SF: Secreção de ferida; SG: Sangue, SO: Secreção ocular.

Assim como na maioria dos pacientes colonizados e infectados, a mesma situação foi observada entre os pacientes que apresentaram somente processo infeccioso, em que apenas um tipo clonal foi identificado dos sítios de infecção e hemocultura (Tabela 16).

Tabela 16: Perfil clonal dos MRSA identificados em pacientes apenas com processo infeccioso causado por um único clone e espécime clínico

spa-type, MLST	Nº/amostras	Nº/pacientes	Espécime clínico
t002/ST5	1(8,4%)	1(10%)	AT
t1094/ST5	2(16,6%)	2(20%)	AT, SA
t318/ST30	4(33,3%)	3(30%)	SA(iii), SG
t037/ST239	2(16,6%)	1(10%)	SA, SG
GKQKAOMQ/NT	2(16,6%)	2(20%)	AT, LP
AKEEEMBKMO/NT	1(8,4%)	1(10%)	AT
	$\Sigma= 12$ isolados	$\Sigma=10$ pacientes	

AT: Aspirado traqueal; LP: Líquido pleural; SA: Secreção de abscesso; SG: Sangue.
(iii): três isolados por espécime clínico.

Em quatro pacientes, foram identificados mais de um clone de MRSA, sendo três pacientes com duas amostras nasais distintas e em um paciente com três amostras distintas (duas de colonização e uma de infecção) (Tabela 17).

Tabela 17: Perfil clonal dos MRSA isolados de pacientes colonizados e/ou infectados por mais de um clone, N/amostras, N/pacientes e espécime clínico

spa-type, MLST	Nº/amostras	Nº/pacientes	Espécime clínico
t1094/ST5; t318/ST30	1/1	1	SN (ii)
t5179/NT; t1094/ST5	1/1	1	SN (ii)
t1094/ST5; t318/ST30	1/1	1	SN (ii)
t127/ST1; t1094/ST5; t318/ST30	1/1/1	1	SN (ii), SG (i)
-	$\Sigma = 9$ amostras	$\Sigma = 6$ pacientes	-

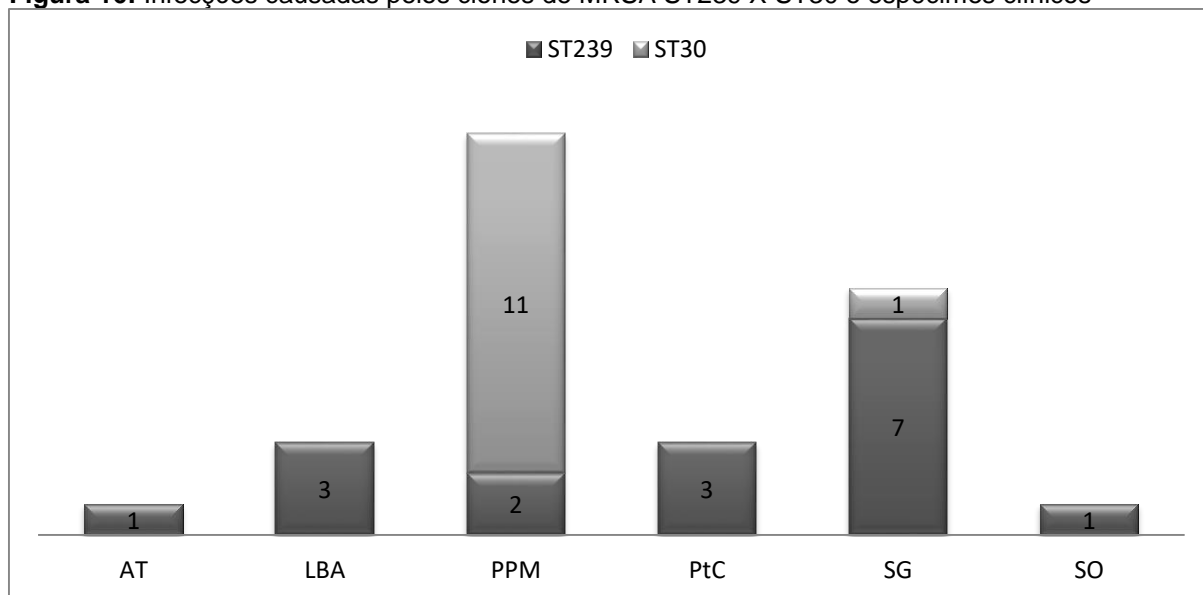
NT: Não tipável; SG: Sangue; SN: Swab nasal.

(i): isolado único.

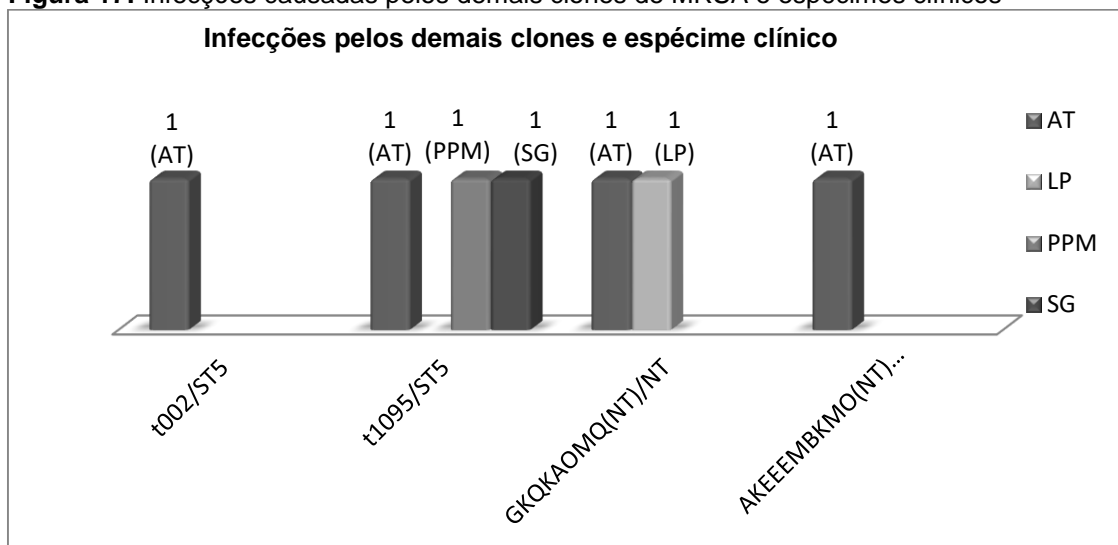
(ii): isolados distintos.

Os principais clones de MRSA identificados em processos infecciosos foram o t037/ST239 (47,2%) e t318/ST30 (30,5%). Observou-se uma diferença entre os tipos de infecções causadas por estas amostras (Figuras 16). Os demais MRSA isolados (ST5/t1094, ST5/t002, GKQKAOMQ e AKEEEMBKMO) foram responsáveis por 22,3% das infecções (Figura 17).

Figura 16: Infecções causadas pelos clones de MRSA ST239 X ST30 e espécimes clínicos

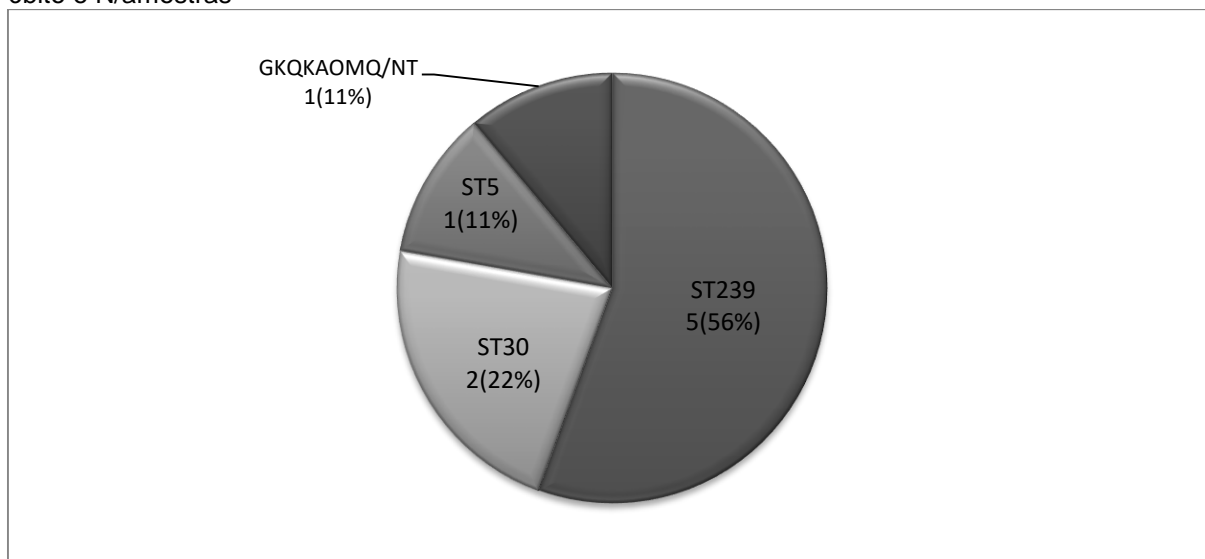


AT: Aspirado traqueal; LBA: Lavado broncoalveolar; PPM: Pele e partes moles; PtC: Ponta de cateter; SG: Sangue; SO: Secreção ocular.

Figura 17: Infecções causadas pelos demais clones de MRSA e espécimes clínicos

AT: Aspirado traqueal; LP: Líquido pleural; NT: Não tipável; PPM: Pele e partes moles; SG: Sangue

Os clones de MRSA identificados nos processos infecciosos relacionados às causas de óbitos foram os t037/ST239, t318/ST30, t1095/ST5 e GKQKAOMQ/NT (Figura 18). Seis entre os nove pacientes que apresentaram processo infeccioso também tiveram resultado positivo para colonização nasal, sendo os mesmos clones identificados nos sítios de infecção e hemocultura.

Figura 18: Perfil clonal dos MRSA identificados de pacientes colonizados e/ou infectados que foram a óbito e N/amostras

12 DISCUSSÃO

Poucos estudos sobre a prevalência de colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em pessoas com HIV foram realizados no Brasil e América Latina (Reinato *et al.*, 2013). O presente estudo analisou 172 amostras de MRSA obtidas por cultura de “swab” nasal de vigilância epidemiológica e espécimes clínicos com suspeita de processo infeccioso, coletados de 764 pacientes HIV positivos internados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI – Fiocruz, localizado na cidade do Rio de Janeiro, no período entre janeiro de 2010 e dezembro de 2015.

A colonização por MRSA tem sido associada a infecções em muitas populações de alto risco. Infecções por este patógeno se apresentam como importante problema de saúde pública, tanto em ambientes de saúde como na comunidade. Indivíduos infectados pelo HIV que são colonizados, estão sob risco 6 a 18 vezes maior em desenvolver infecções por MRSA comparados a população geral, acarretando significativas taxas de morbidade e mortalidade (Zervou *et al.*, 2014).

Nossos resultados demonstraram uma prevalência de colonização nasal por MRSA associada à comunidade de 5,8% (IC 95%: 4,1 – 7,4). O coeficiente de incidência de colonização associada aos cuidados em saúde apresentou uma taxa de 6,6 % (IC 95%: 4,8 – 8,3). A prevalência global de colonização foi de 12,2% (IC 95%: 9,8 – 14,5). Okado e colaboradores relataram uma taxa de prevalência global de 4,8% de colonização associada à comunidade em pacientes HIV positivos em um hospital na área metropolitana da São Paulo (Okado *et al.*, 2016). De acordo com uma metanálise realizada por Zervou e colaboradores, a prevalência de colonização entre indivíduos HIV positivos é de 6,9%, correspondendo com a taxa de 8,8% encontrada nos estudos norte-americanos (Zervou *et al.*, 2014). A prevalência de 5,8% de colonização por MRSA associada à comunidade observada em nosso estudo condiz com os dados obtidos por Santos e colaboradores e Braga e colaboradores, em que 5,9% dos pacientes HIV negativos admitidos na emergência e unidade de terapia intensiva em um hospital na cidade de Porto Alegre (Santos *et al.*, 2010) e 6,2% das crianças de uma creche da cidade de Niterói foram identificados como colonizados por MRSA (Braga *et al.*, 2014), respectivamente.

A incidência de colonização hospitalar de 6,6%, ligeiramente superior à prevalência de colonização associada à comunidade, reforça a importância da

vigilância constante desses indivíduos demonstrada pelo Programa de Busca ativa, identificando 54% do total de colonizados e fornecendo informações quanto ao manuseio desses pacientes, devendo os mesmos permanecerem em isolamento de contato, conforme protocolos de contenção de disseminação de micro-organismos multirresistentes no ambiente hospitalar.

Identificamos, em 2011, um aumento na prevalência de colonização global, associada à comunidade e aos cuidados com a saúde. Tal fato se deve ao provável surto pelo clone ST239 na enfermaria e/ou alteração na sazonalidade das cepas MRSA na comunidade.

A prevalência global de infecção por MRSA apresentou uma taxa de 3,5% (IC 95%: 2,2 – 4,8), com um coeficiente de incidência de infecção nosocomial de 1,3% (IC 95%: 0,7 – 1,9). Analisando somente os pacientes colonizados, a taxa de infecção aumentou para 18,3% (IC 95%: 10,3 – 26,3), corroborando o fato de que o status de colonizado é por si só importante fator de risco para o desenvolvimento de processo infeccioso, condição esta amplamente descrita na literatura (Lowy, 2013).

De acordo com a análise comparativa entre pacientes que adquiriram colonização e foram acometidos por processo infeccioso, foi demonstrado que, entre os que adquiriram colonização comunitária, o tempo médio de internação foi de 37,5 dias, ao passo que os colonizados no ambiente hospitalar permaneceram internados 65 dias em média, representando um acréscimo de 42% no período de permanência no hospital, contribuindo de forma significativa para a morbidade desses indivíduos. O mesmo cenário foi observado entre os pacientes que não foram identificados com colonização, mas desenvolveram infecção por MRSA. Isso reforça ainda mais a importância de identificar os pacientes colonizados, os quais atuam como disseminadores e estão sob maior risco de infecção.

Analisando os dados clínicos e epidemiológicos como possíveis fatores de risco para adquirir colonização nasal por MRSA, foi observado que a internação prévia (OR = 5; IQR 1.5 - 17.8; $p = 0,005$) foi um fator de risco importante. Resultado semelhante foi encontrado em estudos anteriores (Sowash & Uhlemann, 2014; Farley *et al.*, 2015; Okado *et al.*, 2016). Entre as comorbidades, o único valor de p com significância estatística foi observado na hepatite B ($p=0,01$).

A análise por regressão logística demonstrou que pacientes acometidos por processo infeccioso foram 35,5 vezes mais propensos em ir a óbito (OR=35,5; IC95%: 15,3 – 85,5) comparados aos indivíduos sem infecção. Em relação aos indivíduos

colonizados, foi demonstrado que a chance de ir a óbito foi de 65,5 vezes maior (OR = 65,5; IC95%: 29,6 – 166,6) em comparação aos não colonizados.

A contagem geral de CD4 ($p=0,3$) e a quantificação da carga viral ($p=0,5$) não demonstraram significância estatística quando comparadas aos não colonizados. Analisando separadamente os pacientes com colonização comunitária e hospitalar, os valores de p para a contagem de CD4 e quantificação da carga viral foram $p=0,3$ (mediana: 144; IQR: 62 – 252) e $p=0,006$ (mediana: 86,5; IQR: 49 – 37775,5); $p=0,4$ (mediana: 229; IQR: 31 – 487) e $p=0,005$ (mediana: 32702; IQR: 79,5 – 143800,5), respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Vieira e colaboradores em um estudo caso-controle com adultos jovens HIV positivos (Vieira *et al.*, 2016).

Foi constatado que sete pacientes foram a óbito por causas diretamente relacionadas às infecções por MRSA. Um paciente por choque cardiogênico, um por pneumonia e outro por tromboembolismo venoso tiveram MRSA identificados no sangue e ponta de cateter, aspirado traqueal e sangue, respectivamente, no mesmo período relacionado às causas de óbito, três dias em média entre a identificação do processo infeccioso e a data de óbito. Em quatro pacientes, as infecções por MRSA foram identificadas em média 15 dias antes em relação à data do óbito.

O método da caracterização fenotípica da espécie pelo teste da coagulase em tubo e da resistência à metilicina usando disco de cefoxitina de 30 μg foram ratificados pela técnica de PCR em todas as amostras por meio da identificação dos genes *Sa442* e *mecA*, respectivamente, se igualando aos resultados obtidos por Matos e colaboradores em um estudo realizado em hospitais localizados na cidade do Rio de Janeiro (Matos *et al.*, 2010).

A determinação do perfil clonal pela metodologia *spa-typing* (t) e MLST (ST) identificou os seguintes clones de MRSA: t127/ST1, t1094/ST5, t002/ST5, t318/ST30, t037/ST239, t2032/sem correlação ST, t5179/sem correlação ST. Duas amostras com a sequência “GKQKAOMQ” e uma com a sequência “AKEEEMBKMO” obtida na análise inicial por *spa-typing* não apresentaram padrão de leitura pelo *spa* e nem mesmo pelo MLST.

O Clone Epidêmico Brasileiro ST239 (BEC - Brazilian Epidemic Clone) predominou durante toda a década de 1990 como a linhagem prevalente entre os MRSA encontrados nos hospitais brasileiros (Oliveira *et al.*, 2001) e na América do Sul (Sola *et al.*, 2012). Este fato foi confirmado pela caracterização molecular do

primeiro surto de MRSA causado exclusivamente pelo BEC no INI, anteriormente denominado Hospital Evandro Chagas (Teixeira, Lourenço e Figueiredo, 1996). Essa cepa se caracteriza por carrear o SCC*mec* tipo IIIA, ser multirresistente e não possuir os genes que codificam a PVL (leucocidina de Pantón-Valentine) (Brust *et al.*, 2013).

Estudos realizados nos últimos dez anos vêm demonstrando uma mudança no perfil molecular de cepas MRSA encontradas em hospitais brasileiros (Cavalcante *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2016), com a disseminação crescente de duas linhagens: ST5 e ST30. A linhagem ST5 (de Miranda *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2014), conhecida como “USA800” ou “Clone Pediátrico” está relacionada às infecções hospitalares, possui SCC*mec* tipo IV, não possui PVL e apresenta elevado percentual de resistência à eritromicina (Monecke *et al.*, 2011). Já a linhagem ST30, denominada “Clone do Sudoeste do Pacífico” (Clone South West Pacific – SWP) ou “USA100”, classicamente associada às infecções comunitárias (Diep *et al.*, 2006; Mediavilla *et al.*, 2012), possui estreita associação com os genes da PVL, sensibilidade aos antimicrobianos não beta-lactâmicos e carrega o SCC*mec* tipo IV (Diep *et al.*, 2006). Tais clones também se tornaram as linhagens mais comuns em hospitais argentinos (Sola *et al.*, 2012).

No presente estudo, os resultados de tipificação clonal estão de acordo com os dados supracitados. Do total de pacientes com colonização associada aos cuidados em saúde, 26 (52%) estavam colonizados por ST239 (BEC), 11 (22%) por ST5 (Clone Pediátrico), nove (18%) por ST30 (SWP) e quatro (8%) por ST1 (WA-1, USA400). Analisando os pacientes com colonização associada à comunidade, 24 (56%) se apresentaram colonizados por ST30, 10 (23%) por ST5, 5 (12%) por t2032, (2) 4,5% por ST239 e (2) 4,5% por t5179. Do percentual total de cada cepa isolada por paciente, 33 (35,5%) corresponde a ST30, 28 (30,1%) a ST239, 21 (22,6%) a ST5, 5 (5,3%) a t2032, 4 (4,3%) ao clone ST1 e 2 (2,2%) a t5179. Esses resultados realçam a importante participação da linhagem ST30 e, em menor grau, da linhagem ST1, ambas originalmente associadas à comunidade, nos processos de colonização relacionada aos cuidados em saúde, bem como a identificação do ST5 com o segundo percentual mais elevado entre as cepas associadas aos cuidados em saúde, demonstrando a substituição do ST239 (BEC) como o clone prevalente nos hospitais do país até o final da década de 1990.

Consenso entre os pesquisadores, o motivo relacionado ao aumento dos relatos de cepas carreadoras de SCC*mec* tipo IV e V se deve ao cassete cromossômico de menor tamanho comparado aos SCC*mec* I, II e III, conferindo

vantagem evolutiva por obterem melhores taxas de crescimento, facilitada pela melhor mobilidade e transferência desses elementos entre as cepas estafilocócicas (Sowash & Uhlemann, 2014).

A pesquisa dos genes da PVL demonstrou positividade em 89% das amostras da linhagem ST30, 13,5% das amostras do clone ST239 e em 100% das estirpes t2032, t5179 e (GKQKAOMQ). Tais achados estão de acordo com os dados obtidos por Brust e colaboradores, em que o clone ST30 apresentou elevado percentual de positividade para o gene da PVL. Foram identificadas amostras do ST239 PVL-positivas, que classicamente não apresentam tal gene (Brust *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2009). O aumento da prevalência de cepas do ST30 PVL-positivas circulantes nos hospitais brasileiros é, de fato, preocupante. A possibilidade do agravamento do quadro infeccioso impacta diretamente nos gastos com a saúde e na morbimortalidade, principalmente das pessoas vivendo com o HIV. Soma-se o fato dos ST239 PVL-positivos que, além da multirresistência, agora possuem a capacidade de gerar o agravamento do quadro infeccioso devido à produção da toxina, tornando-se extremamente virulento.

Foi observado que, em 16 (94%) dos 17 pacientes colonizados e que desenvolveram infecção, o clone identificado colonizando as narinas anteriores foi o mesmo identificado causando infecção, fato que é amplamente descrito na literatura. Desses pacientes, nove (56,2%) tiveram infecção por ST239, seis (37,5%) por ST30 e um (6,3%) por ST5. Quanto aos pacientes com resultado negativo de cultura de “swab” nasal, as cepas identificadas nos sítios de infecção e hemocultura foram ST5 em três (30%) pacientes, ST30 em três (30%) pacientes, ST239 em um (10%) paciente, GKQKAOMQ em dois (20%) pacientes e AKEEEMBKMO em um (10%) paciente.

Foi observada uma diferença entre os espécimes clínicos com cultura positiva para MRSA entre os clones ST239 e ST30, identificados em 47,2% e 30,5% dos materiais, respectivamente. ST239 foi identificado em aspirado de secreção traqueal (5,9%), lavado broncoalveolar (17,6%), ponta de cateter (17,6%), hemocultura (41,2%), pele e partes moles (11,8%) e secreção ocular (5,9%). O ST30 foi identificado causando infecção em pele e partes moles (91,7%) e em hemocultura (8,2%). Os clones de MRSA identificados nos processos infecciosos relacionados às causas de óbitos foram os ST239 (56%), ST30 (22%), ST5 (11%) e GKQKAOMQ (11%).

Um dado extremamente importante foi que o teste de sensibilidade à vancomicina feito por microdiluição em caldo não identificou MRSA resistente a esse antimicrobiano, sendo todos os valores das CIM correspondendo ao fenótipo sensível conforme estabelecido pelo CLSI. Dessa forma, esse fármaco continua sendo uma opção terapêutica para tratamento dessas cepas.

13 LIMITAÇÕES

Os “swabs” de vigilância coletados em nossa instituição avaliaram somente a colonização nasal. Estudos demonstraram que os dados de prevalência obtidos podem estar subestimados em até um terço, comparados aos casos em que as coletas de “swabs” de vigilância foram estendidas para outros sites de colonização como axilas, garganta, virilhas, períneo e reto (Farley *et al.*, 2015). Em uma metanálise, foi demonstrado que a triagem extra-nasal aumentou a detecção de colonização por MRSA em pelo menos 31,6% (IC 95%, 15,8-50,0). O percentual de rendimento do rastreio na virilha foi de 19,3% (IC 95%, 11,5-28,5), perirretal 18,5% (IC 95%, 7,4-33,2) e das culturas de garganta 17,5% (IC 95%, 12,0-24) (Zervou *et al.*, 2014).

A utilização do ágar manitol salgado para realização da cultura dos “swabs” coletados é uma das técnicas utilizadas para identificação presuntiva da espécie *Staphylococcus aureus*, sendo a mesma utilizada em nosso estudo e rotina laboratorial para triagem inicial das colônias manitol-positivas e posterior confirmação pelo teste da coagulase em tubo. Santos e colaboradores demonstraram que 15% das amostras de MRSA não apresentaram fermentação do manitol (Santos *et al.*, 2015). Logo, uma porcentagem das amostras de *S. aureus* e possíveis MRSA podem ter sido descartadas, subestimando nossos dados de prevalência e incidência de colonização.

14 CONCLUSÃO

No presente estudo, a prevalência de colonização nasal por MRSA nos pacientes HIV positivos, no momento da internação (associada à comunidade), no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-INI-Fiocruz foi de 5,8% (IC 95%: 4,1 – 7,4). A prevalência global de colonização por MRSA em pessoas vivendo com HIV internadas no INI apresentou uma taxa 12,2% (IC 95%: 9,8 – 14,5). Por sua vez, a incidência de colonização nasal por MRSA durante a internação (associada aos cuidados em saúde) demonstrou um coeficiente de 6,6 % (IC 95%: 4,8 – 8,3). O coeficiente de incidência de infecção por MRSA durante o período de internação foi de 1,3% (IC 95%: 0,7 – 1,9), com prevalência global de infecção de 3,5% (IC 95%: 2,2 – 4,8).

A caracterização fenotípica da espécie pelos testes da catalase e coagulase em tubo, bem como a resistência à metilicina pela técnica de disco-difusão com o disco de cefoxitina-30µg foram concordantes com os métodos genotípicos, pois todas as amostras de MRSA apresentaram os genes *Sa442* e *mecA*, respectivamente. Nenhuma amostra foi resistente a vancomicina no teste de microdiluição

Os fatores de risco associados à colonização foram internação prévia nos últimos 12 meses (OR = 5; IQR 1.5 - 17.8; p = 0.005) e ser portador do vírus da hepatite B (p=0,01).

O status de colonizado elevou a prevalência de infecção para 18,3% (IC 95%: 10,3 – 26,3), quando comparada à prevalência global de 3,5% (IC 95%: 2,2 – 4,8). Pacientes colonizados apresentaram chance de ir a óbito 65,5 vezes maior (OR = 65,5; IC95%: 29,6 – 166,6). A identificação de processo infeccioso aumentou em 35,5 vezes a chance de ir a óbito (OR=35,5; IC95%: 15,3 – 85,5).

Os perfis clonais identificados colonizando e/ou infectando essa população foram ST239 (Clone Endêmico Brasileiro), ST30 (Clone do Sudoeste do Pacífico), ST5 (Clone Pediátrico), ST1 (USA400).

BLIBLIOGRAFIA

- AGHOLI, M.; HATAM, G. R.; MOTAZEDIAN, M. H. HIV/AIDS-associated opportunistic protozoal diarrhea. **AIDS research and human retroviruses**, v. 29, n. 1, p. 35–41, jan. 2013.
- APPELBAUM, P. C. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 5, p. 398–408, nov. 2007.
- BABA, T. *et al.* Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9320, p. 1819–1827, 25 maio 2002.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other Catalase-Positive Cocci that grow Aerobically. In: Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC. **Manual of Clinical Microbiology**. 8ª edição, ASM Press Washington DC: 384 – 404; 2003
- BLANK, L. J. *et al.* Herpes zoster among persons living with HIV in the current antiretroviral therapy era. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 61, n. 2, p. 203–207, 1 out. 2012.
- BOYLE-VAVRA, S. *et al.* Structural and topological differences between a glycopeptide-intermediate clinical strain and glycopeptide-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* revealed by atomic force microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3456–3460, dez. 2000.
- BOYLE-VAVRA S, DAUM RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. **Laboratory Investigation**, v.87 p.3-9. Jan 2007.
- BRAGA, E. D. V. *et al.* High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 538, 6 out. 2014.
- BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. [AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 207–217, abr. 2001.
- BRYCE, E. A. *et al.* Evidence of delays in transferring patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant *Enterococcus* to long-term-care facilities. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 4, p. 270–271, abr. 2000.
- BRUST, T. *et al.* Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

carrying the PVL gene outbreak in a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 3, p. 865–868, 2013.

CAVALCANTE, F. S. *et al.* High prevalence of methicillin resistance and PVL genes among *Staphylococcus aureus* isolates from the nares and skin lesions of pediatric patients with atopic dermatitis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 48, n. 7, p. 588–594, jul. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2005. Community associated MRSA information for clinicians. Infection control topics. **Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA**. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html#4. Acessado em 25 de Julho de 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin--United States, 1997. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 46, n. 35, p. 813–815, 5 set. 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 51, n. 40, p. 902, 11 out. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--New York, 2004. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 53, n. 15, p. 322–323, 23 abr. 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Revised surveillance case definition for HIV infection--United States, 2014. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report** v. 63, n. RR-03, p. 1–10, 11 abr. 2014.

CHAMON, R. C. *et al.* Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 185–189, abr. 2017.

CHATTERJEE, S. S.; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 205–217, 2013.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informal Supplement. **CLSI document M100-S23**. 2015;33:72-6.

COLE, J.; POPOVICH, K. Impact of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on HIV-infected patients. **Current HIV/AIDS reports**, v. 10,

n. 3, p. 244–253, set. 2013.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42 Suppl 1, p. S25-34, 1 jan. 2006.

CRUM-CIANFLONE, N. F.; BURGI, A. A.; HALE, B. R. Increasing rates of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among HIV-infected persons. **International journal of STD & AIDS**, v. 18, n. 8, p. 521–526, ago. 2007.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616–687, jul. 2010.

DELEO, F. R. *et al.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9725, p. 1557–1568, 1 maio 2010.

DIEP, B. A. *et al.* Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 4, p. 249–257, 19 fev. 2008.

FARLEY, J. E. *et al.* Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an HIV-positive cohort. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 4, p. 329–335, 1 abr. 2015.

FERREIRA, D. DE C. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in HIV patients: risk factors associated with colonization and/or infection and methods for characterization of isolates - a systematic review. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 69, n. 11, p. 770–776, nov. 2014.

FURUNO, J. P. *et al.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis among HIV patients: a cohort study. **BMC infectious diseases**, v. 11, p. 298, 31 out. 2011.

GARZA-GONZÁLEZ, E. *et al.* Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 5, p. 645–654, maio 2010.

GÓMEZ, M. I. *et al.* *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 842–848, ago. 2004.

GRINSZTEJN, B. *et al.* Towards an ideal antiretroviral regimen for the global HIV epidemic. **Journal of Virus Eradication**, v. 3, n. 3, p. 111–116, 1 jul. 2017.

HARMSSEN, D. *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5442–

5448, dez. 2003.

HAVAEI, S. A. *et al.* Genetic Characterization of Methicillin Resistant and Sensitive, Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus Strains Isolated from Different Iranian Hospitals. **ISRN microbiology**, v. 2012, p. 215275, 2012.

HIDRON, A. I. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in HIV-infected patients. **Infection and Drug Resistance**, v. 3, p. 73–86, 2010.

HIRAMATSU, K. *et al.* The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486–493, out. 2001.

HOWE, R. A. *et al.* Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. **Lancet (London, England)**, v. 351, n. 9102, p. 602, 21 fev. 1998.

IMAZ, A. *et al.* Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in HIV-infected patients in Barcelona, Spain: a cross-sectional study. **BMC infectious diseases**, v. 15, p. 243, 26 jun. 2015.

ITO, T. *et al.* Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 6, n. 1, p. 41–52, fev. 2003.

ITO, T. *et al.* Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2637–2651, jul. 2004.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1449–1458, jun. 1999.

JAPIASSÚ, A. M. *et al.* Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients. **Critical Care (London, England)**, v. 14, n. 4, p. R152, 2010.

KEJELA, T.; BACHA, K. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) among primary school children and prisoners in jimma town, southwest ethiopia. PMID: 23731679 PMCID: PMC3699434: **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2013. v. 12, p. 11.

KHATIB, R. *et al.* Correlation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus vancomycin minimal inhibitory concentration results by Etest and broth microdilution methods with population analysis profile: lack of Etest overestimation of the MIC. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 803–806, jun. 2013.

KLOOS, W. & BANNERMAN, T. *Staphylococcus and Micrococcus*, p. 264-282.

In Murray P, Baron E, Pfaller MA, Tenover F & Tenover F & Tenover F & Tenover F (ed.), **Manual of clinical microbiology**. 1999, ASM Press, Washington DC.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Ed Medsi. 2001. 1465.

KONG, K.-F.; VUONG, C.; OTTO, M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 296, n. 2–3, p. 133–139, abr. 2006.

KOZIOŁ-MONTEWKA, M. et al. Rate of staphylococcus aureus nasal carriage in immunocompromised patients receiving hemodialysis treatment. PMID: 11516945: **International Journal of Antimicrobial Agents**, ago. 2001. v. 18, n. 2, p. 193–196.

LIU, C. et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 3, p. e18-55, 1 fev. 2011.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998.

LOWY, F. D. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: where is it coming from and where is it going? **JAMA internal medicine**, v. 173, n. 21, p. 1978–1979, 25 nov. 2013.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet (London, England)**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 15 dez. 2012.

MARANAN, M. C. et al. Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 813–849, dez. 1997.

MIRANDA, O. P. DE et al. Emergence in Brazil of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1165–1172, dez. 2007.

MARTINEAU, F. et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2541–2547, jul. 2001.

MATOS, P. D. M. DE et al. Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of Staphylococcus aureus isolates carrying different SCCmec types. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 931–934, nov. 2010.

Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST** Ano V - nº 1 - 27^a a 53^a - semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2015 Ano V - nº 1 - 01^a a 26^a - semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2016. Available at: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hivaid-2017>.

MONECKE, S. *et al.* A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e17936, 6 abr. 2011.

MORGADO, M. G. *et al.* Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. The Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 383–386, jun. 1998.

MUSTA, A. C. *et al.* Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1640–1644, jun. 2009.

NAIMI, T. S. *et al.* Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA**, v. 290, n. 22, p. 2976–2984, 10 dez. 2003.

OKADO, J. B. *et al.* Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* dissemination among healthcare professionals and/or HIV patients from a tertiary hospital. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 51–56, fev. 2016.

OKIE, S. Fighting HIV--lessons from Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 19, p. 1977–1981, 11 maio 2006.

OLIVEIRA, G. A. *et al.* Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443–448, jul. 2001.

PARKER, M. T.; JEVONS, M. P. A survey of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Postgraduate Medical Journal**, v. 40, p. SUPPL:170-178, dez. 1964.

REINATO LAF, PIO DPM, LOPES LP, PEREIRA FMV, LOPES AER, GIR E. Colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em indivíduos com HIV/aids atendidos em um hospital-escola brasileiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, n.6, p. 1235–1239, dec 2013.

REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista De Saude Publica**, v. 40, n. 2, p. 331–345, abr. 2006.

ROSSI, F *et al.* Transferable Vancomycin Resistance in a CommunityAssociated MRSA Lineage. **The New England Journal of Medicine**, v. 37, n.16, p. 1524–1531, 17 abril 2014

PEREIRA, V. C.; RIBOLI, D. F. M.; CUNHA, M. DE L. R. DE S. DA. Characterization

of the clonal profile of MRSA isolated in neonatal and pediatric intensive care units of a University Hospital. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, p. 50, 7 nov. 2014.

RIBEIRO, S. R. *et al.* Incidence and determinants of severe morbidity among HIV-infected patients from Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2010. **Antiviral Therapy**, v. 19, n. 4, p. 387–397, 2014.

RODRIGUEZ, M. *et al.* Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary Staphylococcus aureus Strains. **Medicine**, v. 94, n. 37, p. e1534, set. 2015.

ROSSNEY, A. S. *et al.* The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2554–2563, ago. 2007.

SHADYAB, A. H.; CRUM-CIANFLONE, N. F. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections among HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy: a review of the literature. **HIV medicine**, v. 13, n. 6, p. 319–332, jul. 2012.

SKERMAN, V.B.D, MCGOWAN, V. & SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. **Int J Syst Bacteriol.**1980; 30:225-420

SAÏD-SALIM, B. *et al.* Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3373–3379, jul. 2005.

SAKOULAS, G. *et al.* Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2398–2402, jun. 2004.

SANTOS, D. C. M. DOS *et al.* Mannitol-negative methicillin-resistant Staphylococcus aureus from nasal swab specimens in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 531–533, 1 jun. 2015.

SANTOS, H. B. *et al.* Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 328, 14 nov. 2010.

SCHUENCK, R. P. *et al.* 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 Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 434–441, ago. 2009.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006841, set. 2011.

SHOPSIN, B. *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA

sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3556–3563, nov. 1999.

SHORE, A. C. *et al.* Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, ago. 2011.

SOLA, C. *et al.* Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e30487, 2012.

SOWASH, M. G.; UHLEMANN, A.-C. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Case Studies. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1085, p. 25–69, 2014.

STEFANI, S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 273–282, abr. 2012.

STEIN, G. E.; WELLS, E. M. The importance of tissue penetration in achieving successful antimicrobial treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and linezolid. **Current Medical Research and Opinion**, v. 26, n. 3, p. 571–588, mar. 2010.

STENEHJEM, E.; RIMLAND, D. Mrsa nasal colonization burden and risk of mrsa infection. PMID: 23261345 PMCID: PMC3685139: **American journal of infection control**, maio. 2013. v. 41, n. 5, p. 405–410.

STRANDÉN, A. M. *et al.* Emergence of SCCmec type IV as the most common type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital. **Infection**, v. 37, n. 1, p. 44–48, fev. 2009.

STRUELENS, M. J. *et al.* Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 112–119, fev. 2009.

SUNDQUIST, W. I.; KRÄUSSLICH, H.-G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 7, p. a006924, jul. 2012.

TEIXEIRA, L. A.; LOURENÇO, M. C.; FIGUEIREDO, A. M. Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III::B:A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 2, n. 4, p. 393–399, 1996.

THE WORLD BANK. Available at:
<https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL>.

TORTORA, G. *et al.* Procariotos domínios Bacteria e Archea. IN: TORTORA, G et al. **Microbiologia**. Porto Alegre: Ed Artmed. 2005. 305-331

VANDENESCH, F. *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 978–984, ago. 2003.

VIEIRA, M. T. C. *et al.* Living Conditions as a Driving Factor in Persistent Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Colonization Among HIV-infected Youth. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 10, p. 1126–1131, out. 2016.

WANG, G. *et al.* Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3883–3886, nov. 2006.

YOUSEFI, M. *et al.* Identification of tigecycline- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among patients with urinary tract infection in Iran. **New Microbes and New Infections**, v. 19, p. 8–12, set. 2017.

ZERVOU, F. N. *et al.* Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in HIV infection: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59, n. 9, p. 1302–1311, nov. 2014.

ZHANG, K. *et al.* Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 531–540, fev. 2009.

ZHU, W. *et al.* Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 452–457, fev. 2008.