



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

**LUCIANA BORGES GIAROLA**

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS  
DE PACIENTES SOB TRATAMENTO DIALÍTICO E TRANSPLANTADOS  
RENAIS: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES GENÉTICOS (HLA).**

**MARINGÁ**

**2010**

**LUCIANA BORGES GIAROLA**

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS  
DE PACIENTES SOB TRATAMENTO DIALÍTICO E TRANSPLANTADOS  
RENAIS: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES GENÉTICOS (HLA).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. João Bedendo

**MARINGÁ**

**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

G435a Giarola, Luciana Borges  
Avaliação fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes sob tratamento dialítico e transplantados renais: estudo de associação com marcadores genéticos (HLA) / Luciana Borges Giarola. -- Maringá, 2010.  
100 f. : il., tbs.

Orientador: Profº. Dr. João Bedendo  
Dissertação (mestrado em Enfermagem) – Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, 2010.

1. Microbiologia médica. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Tipagem microbiana. 5. Antígenos HLA. I. Bedendo, João, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. III. Título.

CDD 21. ed.616.01

LUCIANA BORGES GIAROLA

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS  
DE PACIENTES SOB TRATAMENTO DIALÍTICO E TRANSPLANTADOS  
RENAIS: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES GENÉTICOS (HLA).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Aprovado em: 20/12/2010

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. João Bedendo (Orientador)  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Botelho Garcia (Titular)  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kazuko Uchikawa Graziano (Titular)  
Universidade Estadual de São Paulo

---

Prof. Dr. Nelson Batista de Oliveira (Suplente)  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Bronharo Tognim (Suplente)  
Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho

Aos meus pais, a minha irmã e ao meu namorado, que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada e que não mediram esforços para que este trabalho pudesse ser concluído. Sem vocês nada disso seria possível!

## AGRADECIMENTOS

A DEUS

Por ser meu refúgio e segurança, conduzindo-me sempre.

Muito Obrigada Senhor!

Aos meus pais Celina e Edson

Que sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para que eu realizasse os meus sonhos... E, acima de tudo, por acreditarem em mim... MUITO OBRIGADA!

A minha irmã Daniela

Por ser, acima de tudo, minha amiga querida e caminhar comigo sempre...

Ao meu namorado Marcelo

Pela confiança, dedicação, incentivo, carinho... E também, por muitas vezes, compreender a minha ausência...

A minha querida amiga, e bolsista Pibic, Rosiane

Que esteve ao meu lado durante todo o mestrado...

Não desistiu em nenhum momento, quantas noites e fins de semana passamos no laboratório...

Rô! Com certeza, sem você este trabalho não teria sido realizado...

A minha amiga Elisangela (Preta)

Amiga que conheci no mestrado e que levarei pra sempre em meu coração...

Foram muitos os momentos compartilhados, sejam os relacionados ao mestrado ou não.

Amiga querida obrigada por tudo, por sempre estar ao meu lado, atender as minhas ligações e sempre ter a palavra certa, na hora certa... Amo muito você...

Ao prof. João Bedendo

Orientador, mestre e amigo... Pelo incentivo, dedicação e por ensinar os caminhos a seguir...

À Profª. Sueli Donizete Borelli pela preocupação de sempre e, também, pelo acolhimento no laboratório de Imunologia.

À Profª. Maria Cristina Bronharo Tognim

Pela amizade, compreensão e pelas dicas importantes nos momentos em que tudo parecia dar errado...

Ao Prof. Benício Alves de Abreu Filho e Prof. Celso Luiz Cardoso.

Por me acolherem no laboratório e pelo muito que me ensinaram, meus sinceros agradecimentos.

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básica.

Por me receberem e acolherem com carinho e, também, pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação Araucária, pela bolsa concedida.

Há um tempo em que é preciso abandonar as  
roupas usadas, que já tem a forma do nosso  
corpo, e esquecer os nossos caminhos, que  
nos levam sempre aos mesmos lugares. É o  
tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-  
la, teremos ficado, para sempre, à margem  
de nós mesmos.

(Fernando Pessoa)

GIAROLA, Luciana Borges. **Avaliação fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes sob tratamento dialítico e transplantados renais: estudo de associação com marcadores genéticos (HLA).** 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno envolvido na etiologia de infecções hospitalares e comunitárias. Indivíduos sadios podem albergar o *S. aureus* na nasofaringe e superfície corporal, sendo que a maioria das infecções invasivas por essa bactéria é endógena. A gravidade da doença depende do perfil de resistência ante os antimicrobianos usualmente utilizados na prática clínica. Pacientes transplantados renais e em diálise são de risco para a colonização, ou infecção, pelo *S. aureus* multirresistente. A infecção está diretamente relacionada com a imunidade do indivíduo e o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) está envolvido em tais funções. Nos seres humanos, tais moléculas são conhecidas como Antígenos Leucocitários Humanos, ou sistema HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigens*. Tem sido demonstrado que diferentes especificidades do HLA podem ser mais frequentes em indivíduos com determinadas doenças, entretanto pouco se conhece sobre a correlação entre a tipagem HLA e o carreamento nasal de *S. aureus*. O presente estudo teve por objetivo identificar a prevalência, o perfil fenotípico e genotípico de amostras de *S. aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de pacientes em tratamento dialítico e transplantados renais, bem como verificar associação entre as moléculas do CPH e a condição de carreamento nasal. A população desta pesquisa foi composta por 111 pacientes em diálise e 48 transplantados renais. As amostras foram submetidas à Coloração de Gram e Teste da Coagulase em tubo. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco difusão e teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O DNA foi extraído com Ctab e a técnica de Reação em Cadeia da polimerase (PCR) foi empregada para a tipagem genética com o oligonucleotídeo RW3A e identificação do gene *mecA* das amostras resistentes à oxacilina. Para tipificação HLA foi utilizado o kit LABType® SSO One Lambda aliado à tecnologia Luminex. Entre os 48 transplantados renais, 75% apresentaram positividade para *S. aureus* em seus vestíbulos nasais, enquanto que entre os 111 em diálise, 49% foram carreadores. Das amostras, 10 foram resistentes à oxacilina e 8 apresentaram o gene *mecA*, todas foram sensíveis à vancomicina e resistentes à penicilina. As demais amostras também mostraram alta taxa de resistência aos demais antimicrobianos. Houve divergência entre os resultados de resistência à oxacilina entre o método de Agar diluição (11%) e disco difusão (8,7%). Os resultados da tipagem genética mostraram um perfil mais homogêneo entre as amostras isoladas de pacientes em diálise do que entre os pacientes transplantados renais. Com relação à tipagem HLA e associação com carreamento nasal de *S. aureus*, independente do grupo de pacientes, observou-se uma maior frequência dos alelos HLA classe I (A\*03, A\*68 e B\*15), como sugestivo de proteção no carreamento do *S. aureus*; para as moléculas HLA classe II, o alelo DRB1\*03 parece estar relacionado como um marcador genético de suscetibilidade ao carreamento da bactéria.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*. Carreamento nasal. Resistência Microbiana a Medicamentos. Tipagem bacteriana. Antígenos HLA.

GIAROLA, Luciana Borges. **Phenotypic and genotypic assessment of *Staphylococcus aureus* isolated from patients on dialysis and kidney transplant: study of association with genetic markers (HLA)**. 2010. 98 f. Dissertation (Master's in Nursing)–Maringá State University, Maringá, 2010.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a pathogen involved in the etiology of nosocomial and community-acquired infections. Healthy individuals can lodge *S. aureus* in the nasopharynx, and body surface, since the majority of invasive infections caused by this bacterium is endogenous. The disease severity depends on the resistance profile in the face of the antimicrobials usually used in the clinical practice. Kidney transplant patients and on dialysis are risk factors for colonization or infection by *S. aureus* multi-resistant. The infection is directly related to the individual's immunity and the Major Histocompatibility Complex (MHC) is involved in such functions. In humans, such molecules are known as Human Leukocyte Antigens, or HLA, from the English *Human Leukocyte Antigens*. It has been shown that different HLA specificities can be more frequent in individuals with certain diseases, however not much is known about the correlation between HLA typing and *S. aureus* nasal carriage. The present study had as objective to identify the prevalence, genotypic and phenotypic profile of *S. aureus* samples isolated from nasal vestibules of patients on dialysis and kidney transplant, as well to verify association between MHC molecules and the condition of nasal carriage. The population of this research was consisting of 111 patients on dialysis and 48 kidney transplant. The samples were subjected to Gram Reaction and Tube Coagulase Test. The antimicrobial susceptibility was evaluated by disc diffusion method and test of determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The DNA was extracted with CTAB and the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied for genetic typing with oligonucleotide RW3A and identification of the *mecA* gene of resistant samples to oxacillin. For HLA typing was used the kit LABType® SSO One Lambda allied to Luminex technology. Among the 48 kidney transplant patients, 75% presented positivity for *S. aureus* in their nasal vestibules, whereas among the 111 on dialysis, 49% were carriers. From the samples, 10 were resistant to oxacillin and 8 presented the *mecA* gene, all were sensitive to vancomycin and resistant to penicillin. The others samples also showed high resistance rate to other antimicrobials. There was disagreement between the results of resistance of oxacillin between the Agar dilution method (11%) and disc diffusion (8.7%). The results of genetic typing showed a more homogeneous profile between isolates samples from dialysis' patients than between kidney transplant patients. In relation to HLA typing and association with *S. aureus* nasal carriage, regardless of the patient group, it was noticed a higher frequency of HLA allele class I (A\*03, A\*68 and B\*15) as suggestive of protection in *S. aureus* nasal carriage; for HLA molecules class II, the allele DRB1\*03 seems to be related, as a genetic marker of susceptibility to the carriage of the bacterium.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*. Nasal carriage. Microbial Resistance to medicines. Bacterial Typing. HLA Antigens.

GIAROLA, Luciana Borges. **Evaluación fenotípica y genotípica de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes bajo tratamiento dialítico y transplantados renales: estudio de asociación con marcadores genéticos (HLA).** 2010. 98 f. Disertación (Máster en Enfermería) - Universidad Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es un patógeno envuelto en la etiología de infecciones hospitalarias y comunitarias. Individuos sanos pueden albergar el *S. aureus* en la nasofaringe y superficie corporal, siendo que la mayoría de las infecciones invasivas por esta bacteria es endógena. La gravedad de la enfermedad depende del perfil de resistencia frente a los antimicrobianos usualmente utilizados en la práctica clínica. Pacientes transplantados renales y en diálisis son de riesgo para la colonización o infección por el *S. aureus* multirresistente. La infección está directamente relacionada con la inmunidad del individuo y el Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) está envuelto en tales funciones. En los seres humanos, tales moléculas son conocidas como Antígenos Leucocitarios Humanos, o sistema HLA, del inglés *Human Leucocyte Antigens*. Ha sido demostrado que diferentes especificidades del HLA pueden ser más frecuentes en individuos con determinadas enfermedades, sin embargo poco se conoce sobre la correlación entre el tipaje HLA y la portación nasal de *S. aureus*. El presente estudio tuvo por objetivo identificar la prevalencia, el perfil fenotípico y genotípico de muestras de *S. aureus* aisladas de los vestíbulos nasales de pacientes en tratamiento dialítico y transplantados renales, así como verificar asociación entre las moléculas del CPH y la condición de portación nasal. La población sujeto de esta investigación fue compuesta por 111 pacientes en diálisis y 48 transplantados renales. Las muestras fueron sometidas a la Coloración Gram y Test de Coagulasa en tubo. La susceptibilidad a los antimicrobianos fue evaluada por el método de disco difusión y test de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). El DNA fue extraído con Ctab y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue empleada para el tipaje genético con el oligonucleótido RW3A e identificación del gen *mecA* de las muestras resistentes a oxacilina. Para tipificación HLA fue utilizado el kit *LABType® SSO One Lambda* aliado a la tecnología Luminex. Entre los 48 transplantados renales, 75% presentaron positividad para *S. aureus* en sus vestíbulos nasales, mientras que entre los 111 en diálisis, 49% fueron portadores. De las muestras, 10 fueron resistentes a oxacilina y 8 presentaron el gen *mecA*, todas fueron sensibles a vancomicina y resistentes a penicilina. Las otras muestras también mostraron alta tasa de resistencia a los otros antimicrobianos. Hubo divergencia entre los resultados de resistencia a la oxacilina entre el método de Dilución en Agar (11%) y disco difusión (8,7%). Los resultados del tipaje genético mostraron un perfil más homogéneo entre las muestras aisladas de pacientes en diálisis que entre los pacientes transplantados renales. Con relación al tipaje HLA y asociación con portación nasal de *S. aureus*, independiente del grupo de pacientes, se observó una mayor frecuencia de los alelos HLA clase I (A\*03, A\*68 e B\*15) como sugestivo de protección en la portación del *S. aureus*; para las moléculas HLA clase II, el alelo DRB1\*03 parece estar relacionado como un marcador genético de susceptibilidad a la portación de la bacteria.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*. Portación nasal. Resistencia microbiana a medicamentos. Tipaje bacteriano. Antígenos HLA.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 5.1

- Tabela 1 Distribuição da resistência aos antimicrobianos dos *S. aureus* isolados de pacientes em diálise e transplantados renais da Santa Casa de Maringá, 2009..... 60
- Tabela 2 Distribuição da resistência aos antimicrobianos das dez amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina isolados de pacientes em diálise (D) e transplantados renais (T) da Santa Casa de Maringá, 2009..... 60

### ARTIGO 5.2

- Tabela 1 Frequência alélica (HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1) em pacientes em tratamento dialítico de um Hospital do Norte do Paraná e colonização nasal por *Staphylococcus aureus*..... 74
- Tabela 2 Frequência alélica (HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1) em pacientes transplantados renais de um Hospital do Norte do Paraná e colonização nasal por *Staphylococcus aureus*..... 75

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1

- Figura 1 Resultados da análise de similaridade das amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes em diálise realizado pelo programa Numerical Taxonomy System (NTSYS)..... 61
- Figura 2 Resultados da análise de similaridade das amostras de *S. aureus* de pacientes transplantados realizado pelo programa Numerical Taxonomy System (NTSYS)..... 61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Agar Mueller Hinton
AMS	Agar Manitol Salgado
ATCC	<i>American Type Culture Colleciton</i>
CA-MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> comunitário resistente à meticilina/oxacilina
CH- MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> hospitalar resistente à meticilina/oxacilina
CIA	Clorofórmio álcool Isoamílico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COPEP	Comitê Permanente de Ética em Pesquisa
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CTAB	<i>Cetyl Trimethylammonium Bromide</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra- Bromide
FE	Fração etiológica
<i>Fem</i>	<i>Factor essential for methicilyn resistance</i>
FP	Fração preventiva
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina/oxacilina
NACL	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NTSYS	<i>Numerical Taxonomy System</i>
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina/meticilina
PBP	Proteína fixadora de penicilina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RR	Risco relativo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal Chromosomal Cassette</i>
SSOP	<i>Sequence specific oligonucleotide probes</i>
SSP	<i>Sequence specigic primers</i>

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Solução de Tris-HCL 10mM e EDTA 1mM
TSB	Caldo de Soja Trypticaseína
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VISA	<i>S. aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRSA	<i>S. aureus</i> resistentes à vancomicina

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
3.1	O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	23
3.2	MORFOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICIDADE DOS <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	24
3.3	COLONIZAÇÃO.....	26
3.4	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	27
3.5	TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	30
3.6	ESTUDOS GENOTÍPICOS.....	32
3.7	TIPAGEM HLA.....	33
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	37
4.2	PROCEDIMENTOS.....	37
4.2.1	<b>Coleta de material biológico</b> .....	37
4.2.2	<b>Semeadura e identificação (Gram e Coagulase)</b> .....	38
4.2.3	<b>Estocagem</b> .....	38
4.3	SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	39
4.3.1	<b>Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b> .....	39
4.3.2	<b>Teste de disco difusão</b> .....	40
4.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	41
4.4.1	<b>Extração de DNA</b> .....	41
4.4.2	<b>Genotipagem com o <i>Primer RW3A</i></b> .....	42
4.4.3	<b>Identificação do gene <i>mecA</i></b> .....	43
4.5	TIPAGEM HLA.....	43
4.5.1	<b>Extração de DNA humano</b> .....	43
4.5.2	<b>Polimorfismo genético das moléculas HLA</b> .....	44
4.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	44

4.7	COMITÊ DE ÉTICA.....	44
5	<b>ARTIGOS</b> .....	46
5.1	FREQUÊNCIA DE CARREAMENTO, ASPECTOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE PACIENTES EM DIÁLISE E TRANSPLANTADOS RENAIIS EM UM HOSPITAL DO NORTE DO PARANÁ.....	46
5.2	ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS HLA E O CARREAMENTO NASAL DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADAS DE PACIENTES EM DIÁLISE E TRANSPLANTADOS RENAIIS EM UM HOSPITAL DO NORTE DO PARANÁ.....	62
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
	<b>APÊNDICES</b> .....	94
	<b>ANEXOS</b> .....	96

## 1 INTRODUÇÃO

Indivíduos sadios são colonizados por *Staphylococcus spp* desde o início da vida, podendo albergar o micro-organismo na nasofaringe, superfície corporal e na vagina. A partir desses sítios podem contaminar as demais membranas mucosas ocasionando infecções endógenas, perfazendo aproximadamente 80% das infecções invasivas por *Staphylococcus aureus*, que são causadas por cepas disseminadas a partir da nasofaringe de carreadores (VON EIFF; BECKER; MACHKA et al., 2001; WERTHEIM; VOS; OTT et al., 2004).

Aproximadamente 20% da população adulta é carreadora de *Staphylococcus aureus* na nasofaringe, outros 30% carregam intermitentemente e 50% não são carreadores (BOYCE, 1994; WERTHEIM; MELLES, VOS et al., 2005). Carreadores nasais persistentes de *S. aureus* têm risco aumentado para o desenvolvimento de infecção e características genéticas e raciais do hospedeiro, bem como fatores biológicos do micro-organismo podem possivelmente desempenhar papel importante no processo de colonização (GONZALEZ-ZORN; SENNA; FIETTE et al., 2005; VAN LEEUWEN; MELLES; ALAIDAN et al., 2005).

Pacientes submetidos à diálise têm sido acometidos por infecções e entre os patógenos mais prevalentes se encontram os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos (ALONSO; FLORES; MARTÍNEZ, 2000; FERREIRA; ANDRADE; SANTOS et al., 2005). Pacientes transplantados renais e em diálise são de risco para a colonização ou infecção pelo *S. aureus* multirresistente, visto que fazem uso constante e prolongado de antimicrobianos, sofrem constantes internações hospitalares, são submetidos a procedimentos invasivos, têm contato com pacientes e profissionais colonizados. Indivíduos transplantados renais têm risco adicional devido ao uso de imunossupressores que ocorre logo após a realização do transplante (CHAMBERS, 2001; MARTINS, 2002; SAIID-SALIM; MATHEMA; KREISWIRTH, 2003; RICARDO, 2004; HONG; GORAN, 2006).

A colonização nasal por *S. aureus* é motivo de preocupação quando se trata de procedimentos cirúrgicos (SANTOS; DARINI, 2002; FELIX JUNIOR, 2007), e sua eliminação dos vestíbulos nasais poderia evitar as infecções de origem endógena (VON EIFF; BECKER; MACHKA et al., 2001; MENOGOTTO; PICOLI, 2007).

*Staphylococcus* coagulase negativos geralmente estão associados a infecções em dispositivos e aparelhos implantados, e os *Staphylococcus aureus*, envolvidos em infecções cutâneas e alimentares. Estes têm como característica marcante a versatilidade em adquirir

resistência aos antimicrobianos, especialmente aos betalactâmicos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998; EL-FAR; RICHTMANN, 2001; BRASIL, 2004a).

A resistência à oxacilina é um marcador de resistência que se estende a todas as drogas betalactâmicas utilizadas na terapêutica, sendo um instrumental importante em estudos epidemiológicos, pois se trata de um marcador de multirresistência também para outros grupos de antibacterianos (FERNANDES et al., 2000; COUTO; PEDROSA, 2003; SILVA; RAVANELLO, 2003). Ao longo dos anos, devido à grande exposição dos micro-organismos aos diferentes grupos de antimicrobianos, foi inevitável o aparecimento de cepas resistentes à penicilina, à oxacilina/meticilina e à vancomicina (CHAMBERS, 2001; MOURA; GIR, 2007).

As diferenças entre o *Staphylococcus aureus* hospitalar (CH-MRSA) e o *Staphylococcus aureus* comunitário (CA-MRSA) residia na sensibilidade aos antimicrobianos, nos fatores de virulência e no quadro clínico da doença (RIBAK; LAPLANTE, 2005), entretanto recentemente está ocorrendo uma mudança no perfil epidemiológico dessas bactérias. Estudo realizado no Brasil, com uma população da comunidade, verificou uma prevalência de 40% para o *S. aureus* e 7,5% de resistência à oxacilina, mostrando assim que cepas oxa-resistentes já estão presentes na comunidade. Os autores também ressaltam a escassez de pesquisas com *S. aureus* resistente à oxacilina no Brasil (MENEGOTTO; PICOLI, 2007).

*S. aureus* é um agente etiológico importante que se destaca por sua elevada frequência de ocorrência e patogenicidade a qual o capacita a produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em hígidos. Tem facilidade em se disseminar no ambiente hospitalar e versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos (ENRIGHT; ROBINSON; RANDLE et al., 2002).

Os genes que conferem resistência bacteriana às drogas podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídios, sendo que este DNA pode ser transferido a outras gerações por meio da conjugação. A resistência à oxacilina, em algumas amostras de *S. aureus*, é mediada por PBP2a, uma proteína fixadora de penicilina (PBP) alterada, que tem baixa afinidade por antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (UTSUI; YOKOTA, 1985). A PBP2a é codificada pelo gene *mecA* que se situa em um *Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* (SCC*mec*), um elemento genético móvel, composto por 7 subunidades genéticas (I a VII), as quais conferem a resistência à meticilina/oxacilina e são transferíveis entre espécies de *Staphylococcus sp* (SOUSA; SANCHES; VAN BELKUM et al., 1996; SANCHES; LESKI;

OLIVEIRA; et al., 1998; ITO; KATAYAMA; ASADA et al., 2001; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). A identificação do gene *mecA* no genoma bacteriano de *S. aureus* é importante, uma vez que nem toda resistência aos antimicrobianos está envolvida com a presença desse gene. Outros mecanismos podem estar envolvidos, como degradação enzimática dos antimicrobianos, alteração na permeabilidade da membrana e alteração no sítio ativo (NEVES; ROSSI JUNIOR; ALVES et al., 2007; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009a). A identificação do tipo de resistência e a forma pela qual é transmitida pode ser um instrumental importante na prevenção e controle da infecção estafilocócica de origem hospitalar ou comunitária.

A infecção está diretamente relacionada com a imunidade do indivíduo e o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), que consiste em um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossomo 6 humano, o qual está envolvido nas funções imunológicas. Em particular, o CPH contém um grupo de genes que codificam diversas proteínas que são expressas na superfície de vários tipos celulares. Nos seres humanos, tais moléculas são conhecidas como Antígenos Leucocitários Humanos, ou sistema HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigens* (PEAKMAN; VERGANI, 1999).

Tem sido demonstrado que diferentes especificidades HLA podem ser mais frequentes em indivíduos com determinadas doenças e a caracterização dessas moléculas podem ter importantes implicações clínicas (NEUSTADT, 1977; SINGH; KAUL, R.; KAUL, A. et al., 2007; JACOBSON; HUBER; TOMER, 2008).

A participação do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) na patogênese de doenças tem sido investigada em pacientes portadores de doenças dermatológicas (ARNET, 1985; BIRAL; MAGALHÃES; WASTOWSKI et al., 2006; BELAZARIAN, 2008), tuberculose (JOHN; MURUGESAN; JEYASSELAN et al., 1995; HARFOUCH-HAMMOUD; DAHER, 2008), doenças psiquiátricas (GAUGHRAN, 2002; NUNES; BORELL; MATSUO et al., 2005), patologias auditivas (YEO et al., 2000; AMOR-DORADO; PACO; MARTIN et al., 2005), oftalmológicas (QUIROZ-MERCADO; SUÁREZ-LICONA; FROMOW-GUERRA et al., 2002; UETA; TOGUNAGA; SOTOZONO et al., 2008) e renais (CRISPIM; MENDES-JUNIOR; WASTOWSKI et al., 2008), no entanto pouco se conhece sobre a correlação entre a tipagem HLA das diferentes etnias populacionais e a condição de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus*. O único trabalho encontrado na literatura relacionado ao tema data de 1983, em que foi investigada associação entre as moléculas HLA e o carreamento nasal de *S.*

*aureus* entre trabalhadores saudáveis de um laboratório e pacientes atendidos em uma clínica (KINSMAN; McKENNA; NOBLE, 1983).

No que se refere ao estudo genético de amostras bacterianas, diferentes técnicas moleculares podem ser empregadas, dentre elas se destaca a técnica da “Reação em Cadeia da Polimerase” (PCR), com a utilização de *primers* específicos (TENOVER; ARBEIT; ARCHER et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2008) e por meio dos quais são identificados diferentes marcadores. Com essa técnica é possível amplificar milhões de vezes um ou mais segmentos de marcadores genéticos conhecidos. Essa técnica tem se mostrado útil, versátil e com alto poder discriminatório quando se necessita identificar a presença de genes de resistência, ou proceder a diferenciação genética entre cepas (OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002; SILVA-PEREIRA, 2003; COOKSON; ROBINSON; MONK et al., 2007).

Estudos têm mostrado que o uso da técnica de PCR, com sequências repetitivas, tem sido útil na tipagem genética de diferentes microrganismos (REP\_PCR) (LYON; GILLESPIE; SKURRAY, 1987; DYKE; AUBERT; EL SOLH, 1992; WEI; UDO; GRUBB, 1992; DERBISE; DYKE; EL SOLH, 1994; RICE; THORISDOTTIR, 1994; MORVAN; AUBERT; GODARD et al., 1997). Essa metodologia possibilita uma melhor compreensão das relações evolutivas entre os clones de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) (LENCASTRE; WU; PINHO et al., 1999) e o rastreamento para identificação da fonte de transmissão.

A vigilância epidemiológica dos *S. aureus* inclui o emprego de métodos de tipagem bacteriana. Métodos fenotípicos tradicionais tais como antibiograma, biotipagem, fagotipagem, sorotipagem frequentemente não apresentam suficiente poder discriminatório (PFALLER, 1993; ISSACK; POWER; FRENCH, 1996) e são dependentes de condições ambientais (MOURA, 2000). A presença de polimorfismo na molécula de DNA genômico é um marcador importante para se distinguir estirpes de uma mesma espécie bacteriana (HALL, 1994). A detecção deste polimorfismo pode ser feita, entre outros, com o emprego da técnica da PCR, empregando-se sequências repetitivas (MERCIER; JUMAS-BILAK; ALLARDET-SERVENT et al., 1996). Essas sequências, também denominadas de sequências repetitivas palindrômicas, foram inicialmente descobertas em bactérias entéricas e mais tarde foram encontradas no genoma de outros gêneros e espécies bacterianas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; TYLER et al., 1997).

O *primer* RW3A representa uma sequência repetitiva e tem sido usado para tipagem genética de amostras bacterianas (DEL VECCHIO; PETROZIELLO; GRESS et al., 1995;

REINOSO; BETERA; ODIERNO et al., 2007). Por meio da técnica da PCR ocorre a formação de vários fragmentos, podendo variar entre 3 e 12 (DEL VECCHIO; PETROZIELLO; GRESS et al., 1995). Esses produtos amplificados podem ser visualizados por meio da eletroforese, o que possibilita a construção de um dendograma, demonstrando a similaridade entre as amostras. A partir da detecção do perfil genético destas, é possível fazer inferências sobre as relações entre os diferentes clones, identificando as rotas de dispersão da infecção (SOMMERÄUSER; KLOPPERT; WOLTER et al., 2003).

Pacientes com insuficiência renal estão potencialmente sujeitos à aquisição de *S. aureus* devido à constante exposição a fatores de risco. A identificação do portador nasal de *S. aureus* e o estudo fenotípico e genotípico das amostras contribuem para o conhecimento da epidemiologia da infecção e embasam a implementação de medidas de prevenção e controle. Cepas com alto potencial virulento também têm sido encontradas em casos graves de infecção na comunidade e em indivíduos saudáveis (O'RIORDAN; LEE, 2004). Considerando que o carreador de *S. aureus* parece ser preditor de infecção, faz-se necessária sua investigação como estratégia de prevenção (GOULD, 2005).

Estudos de associação das moléculas HLA e a condição de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* têm sido pouco investigados e podem ser uma ferramenta importante para determinar se os diferentes polimorfismos genéticos estão envolvidos nesse carreamento.

Com os resultados obtidos, espera-se poder contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia da infecção estafilocócica em pacientes com insuficiência renal nos serviços de diálise em nosso meio.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes sob tratamento dialítico e transplantados renais, bem como avaliar a correlação entre a tipagem HLA desses pacientes e a condição de carreamento nasal por *Staphylococcus aureus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a ocorrência de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* entre pacientes submetidos a tratamento dialítico e transplantados renais;
- Identificar o perfil de resistência às drogas antimicrobianas das amostras de *S. aureus* isoladas;
- Identificar, por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, a presença do gene *mecA* nas amostras isoladas resistentes à oxacilina;
- Identificar, pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, o perfil genético das amostras isoladas, empregando-se o oligonucleotídeo RW3A;
- Investigar a influência dos marcadores genéticos do Complexo Principal de Histocompatibilidade, HLA classe I e II, e a condição de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* entre os pacientes sob tratamento dialítico e transplantados renais.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*. Exibem-se na forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, compondo-se em cachos em virtude da sua divisão ocorrer de maneira aleatória e em vários planos. Suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro, convexas, opacas, cremosas e suas cores variam do branco a várias tonalidades de amarelo, dependendo da espécie. São bactérias imóveis e não esporuladas (KONEMAN et al., 2008).

As bactérias pertencentes a esse gênero apresentam crescimento satisfatório na faixa de temperatura de 4 °C a 46 °C, sendo a temperatura ótima de 35 °C a 37 °C e são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOFF, 2000). Apresentam capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO; LANDGRAFF, 2000).

Os estafilococos são anaeróbios facultativos, termonuclease e catalase positivas, coagulase positivas ou negativas dependendo da espécie (KLOSS; LAMBE, 1991), sendo que somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase positivas. A maioria das demais espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativa (BAIRD-PARKER, 1990; TRABULSI et al., 2002).

O gênero *Staphylococcus* possui aproximadamente 42 espécies diferentes (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006), sendo 20 associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais (KONEMAN et al., 2008). Em patologias humanas, as principais espécies envolvidas são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* (TRABULSI et al., 2002).

O *Staphylococcus epidermidis* geralmente está associado a infecções em dispositivos e aparelhos implantados, o *Staphylococcus saprophyticus* é comum em infecções do trato urinário em mulheres, e o *Staphylococcus aureus* é capaz de provocar desde infecções cutâneas e toxinfecções alimentares, até infecções graves e fatais (JAWETZ; MELNICK;

ADELBERG, 1998; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006; SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007; BRAGA et al., 2008).

### 3.2 MORFOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICIDADE DOS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

*S. aureus* é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos, estando relacionado à grande parte dos processos infecciosos, tanto de origem hospitalar quanto comunitária. Na maioria das vezes, estão relacionados a infecções superficiais e discretas, mas em indivíduos debilitados por imunossupressão, doenças crônicas, queimaduras e traumas físicos, *S. aureus* pode causar infecções mais graves e até fatais. No caso de infecções mais profundas, destacam-se a bacteremia, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite e artrite bacteriana (TRABULSI et al., 2002; SPICER, 2002; MARTINS, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TEIXEIRA et al., 2008).

Devido a sua importância clínica, é a espécie mais extensamente estudada. *S. aureus* é responsável por uma ampla quantidade de problemas médicos, incluindo infecções de sítios cirúrgicos, pele e tecidos moles (foliculites, piodermites, impetigo, furúnculos e abscessos), bem como doenças toxinogênicas (síndrome estafilocócica da pele escaldada ou doença de Ritter, síndrome estafilocócica do choque tóxico e intoxicações alimentares). Vários casos de infecções já foram associados a procedimentos médicos, incluindo o uso de próteses, imunossupressores e cateteres (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

É encontrado no ambiente externo e nas fossas nasais de 20-40% dos adultos, enquanto que 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente (BANIA; DABROWSKA; KORZEKWA et al., 2006). Outros sítios de colonização incluem pregas cutâneas, períneo, axilas, vagina, garganta, intestino, pele humana e mucosas, tais como bucal, nasal e auricular. As infecções estafilocócicas podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou de portadores saudáveis que ocorrem por contato, direto ou indireto, com o micro-organismo (KONEMAN et al., 2001; BERNARDO et al., 2005).

*S. aureus* são patógenos oportunistas e a maioria das cepas produz hemolisinas, as quais são enzimas que destroem as hemácias. São desoxirribonuclease (DNase) e nuclease termoestável positivos, novobiocina sensíveis e fermentam manitol (TRABULSI et al., 2002).

Morfologicamente são cocos Gram e coagulase positivos, encontrados em diversas formas, desde isolados, aos pares ou agrupados, com distribuição de cachos irregulares, semelhante a um cacho de uva (MARTINS, 2002; SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007).

Os *S. aureus* têm aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, são imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados, pertencentes à família *Micrococcae* (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998; SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007). Crescem rapidamente na maioria dos meios a 37° C, porém é em temperatura ambiente que melhor forma seu pigmento, em meio sólido se apresenta arredondado, elevado e brilhante. As colônias geralmente possuem a cor acinzentada ou amarelo-dourado intenso (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

Os estafilococos são células procariotas, apresentam membrana plasmática que envolve o citoplasma e circunda a parede celular, protegendo a célula de lises, sua permeabilidade facilita a nutrição. São compostos por densa camada de peptidoglicano, formados por glicanos e aminoácidos, sendo alvo dos glicopeptídeos, os quais são drogas que impedem a formação dos aminoácidos (MURRAY, 1999).

A patogenicidade do *S. aureus* é relacionada a uma série de fatores, sendo que geralmente envolve diversas proteínas extracelulares, como a produção de citotoxinas e exoenzimas (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002). Certas cepas produzem várias toxinas extracelulares bem como fatores de virulência que corroboram para a patogenicidade do micro-organismo, garantindo o sucesso na sua instalação, desenvolvimento e manutenção no tecido hospedeiro (AKINEDEN; ANNEMULLER; HASSAN et al., 2001; DEGO; VAN DIJK; NEDERBRAGT, 2002; PALMQVIST; FOSTER; TARKOWSKI et al., 2002; STEVENS; MA; SALMI et al., 2007).

A maioria dos *S. aureus* possui em sua parede celular a proteína A, que se liga ao peptidoglicano, interferindo na opsonização pelos leucócitos e impedindo a eliminação da bactéria pelo sistema imune (MURRAY, 1999). Ao redor da parede celular pode haver também uma camada denominada cápsula, com função de proteger o micro-organismo pela inibição da quimiotaxia e fagocitose por leucócitos polimorfonucleares e promover sua adesão a materiais sintéticos. A cápsula também facilita a formação de abscessos e aderência à superfície endotelial *in vitro*, sugerindo sua importância na colonização e persistência em superfícies mucosas (MURRAY, 1999; O'RIORDAN; LEE, 2004).

Glicopeptídeos e ácidos teicóicos, componentes da parede celular do *S. aureus*, também auxiliam na aderência a mucosas do hospedeiro, ativam o sistema complemento,

inibem a quimiotaxia de leucócitos e estimulam a produção de anticorpos (SALDADO; PIGNATARI; BELLINATI-PIRES, 2004).

### 3.3 COLONIZAÇÃO

O *S. aureus* pode estar presente na pele e membranas mucosas dos seres humanos, sendo as fossas nasais o principal reservatório. As doenças causadas por essa bactéria podem ter manifestações clínicas ou ser assintomática, caracterizando os indivíduos que albergam o *S. aureus* e não apresentam sintomatologia ou lesões aparentes, eles são genericamente conhecidos como “portadores são ou assintomáticos” (SANTOS; DARINI, 2002; LU; CHIN; PENG et al., 2005; ONONUGA; OYI; ONAOLAPO, 2005; CAVALCANTI; FRANÇA; VILELA et al., 2006).

Os principais sítios de colonização do *S. aureus* são o vestíbulo nasal (35%) e região perineal (20%). Demais regiões do corpo podem também albergar esse micro-organismo, como as regiões umbilical, axilar e interpododáctila, que, juntas, apresentam entre 5% a 10% (CAVALCANTE; FRANÇA; VILELA et al., 2006). A transmissão pode ocorrer por contato direto ou indireto, o que possibilita a contaminação do paciente pelos profissionais de saúde, que assistem a outros hospitalizados portadores, ou no manuseio de objetos contaminados (ELLIOT; KELLUM; TENOVER et al., 2002; TAMMELIN et al., 2003).

O portador da bactéria desempenha papel de grande relevância na epidemiologia e patogênese da infecção, aparecendo como importante fator de risco nos casos de infecções hospitalares, uma vez que pode desenvolver uma infecção endógena, bem como ser uma fonte de contaminação para demais pacientes (VANDENBERGH; VERBRUGH, 1999; PERL et al., 2002). O indivíduo colonizado também se apresenta como importante fonte de transmissão de *S. aureus* para indivíduos da comunidade, sobretudo para familiares, amigos e contactantes. Profissionais de saúde, por conviverem em ambiente hospitalar, podem carrear e disseminar estirpes multirresistentes (CHAMBERS, 2001), dessa forma, agravando a morbimortalidade.

### 3.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O conhecimento sobre a resistência a agentes químicos e físicos entre os micro-organismos teve início com a era microbiana, com o uso das primeiras substâncias químicas com a função antimicrobiana. A introdução do uso dos antibióticos, no período de 1940 e 1950, trouxe a falsa ilusão de que esses medicamentos seriam a solução para os inúmeros casos de morte causada pelas doenças infecciosas (MEREILLON, 1995; TAVARES, 2000).

O grande advento do uso dos antimicrobianos, introduzidos tanto na prática clínica quanto na indústria alimentícia, induziu os micro-organismos a alterações adaptativas fenotípicas e genotípicas, os quais, uma vez modificados, têm a capacidade de se disseminar no ambiente, estabelecer reservatórios ecológicos, colonizar e causar doenças (OLIVEIRA; TOMASZ; LECASTRE, 2002).

A resistência aos antibióticos ocorre em virtude de um cenário multifatorial, que inclui o emprego inadequado e/ou excessivo dos antimicrobianos no ambiente hospitalar, na comunidade, nas indústrias alimentícias e veterinárias, bem como a facilidade com que os micro-organismos resistentes ultrapassam as barreiras geográficas. A importância dos antibióticos na resistência das bactérias reside no seu papel selecionador das estirpes resistentes (TAVARES, 2000; HOSEIN; HILL; JENKINS et al., 2002; SEFTON, 2002).

Dessa forma, faz-se necessário o conhecimento prévio do perfil de resistência de cada microrganismo, antes do início da terapia medicamentosa, bem como seu uso cauteloso (AUBRY-DAMON; COURVALIN, 1999). Logo após a introdução dos antibióticos se pôde constatar o fenômeno da resistência como no caso do *S. aureus*, em que nos anos 40 e 60 já tinham sido identificadas amostras resistentes à penicilina e oxacilina, respectivamente (MAXWEL; FORD; PETERSON et al., 1969; ENRIGHT; ROBINSON; RANDLE et al., 2002; MENEGOTTO; PICOLI, 2007; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

O *S. aureus* é um agente etiológico que apresenta virulência intrínseca, causa diversas infecções potencialmente fatais e se adapta às diferentes condições ambientais. Assim, acompanhar a evolução da resistência do *S. aureus* é de extrema importância, não só por ser uma das bactérias mais frequentes na prática médica, mas também por sua capacidade em adquirir resistência aos antimicrobianos com diferentes matizes de expressão fenotípica a um mesmo antibiótico (TODA, 2003).

Em 1959, ocorreu o início da produção de penicilinas semissintéticas, que com a alteração na cadeia do precursor da penicilina, levou à proteção do anel betalactâmico contra a ação hidrolítica das betalactamases. A meticilina foi a primeira penicilina semissintética produzida e posteriormente outros componentes resistentes à ação das penicilinas foram desenvolvidas, como a oxacilina. No entanto, logo após sua introdução amostras resistentes foram identificadas (MIMICA; MENDES, 2007).

Três mecanismos podem estar envolvidos na resistência à meticilina: a superprodução de beta-lactamases, a presença de uma proteína ligadora de penicilina e as alterações na capacidade de ligação das PBPs (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2008). Para que os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos cumpram sua função é necessário uma interação com as proteínas ligadoras de penicilina (*Penicillium Binding Proteins* - PBPs), que ficam localizadas nas membranas da célula da bactéria e são responsáveis pela biossíntese da parede celular, dessa forma os betalactâmicos impedem a formação completa da camada de peptidoglicano que compõe a parede celular. A resistência dos estafilococos à meticilina/oxacilina é resultado de alterações das PBPs onde o gene *mecA* modifica essas proteínas de membrana, codificando uma nova proteína de ligação denominada PBP2a ou PBP2', cuja afinidade com os  $\beta$ -lactâmicos é muito baixa. Tal resistência pode depender de alguns fatores ambientais, como pH, temperatura e osmolaridade (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; NEVES; ROSSI JÚNIOR; ALVES et al., 2007).

Alguns genes auxiliam o gene *mecA* a expressar um elevado grau de resistência aos betalactâmicos, tais genes são denominados de genes auxiliares ou fatores essenciais ou genes *fem* (*factor essential for methicillin resistance*). Foram identificados seis genes *fem* denominados: *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF*. A presença do gene *femA* parece ser própria dos *S. aureus*, não sendo detectada em outras espécies de estafilococos, tal gene é fundamental para a expressão da resistência das amostras de ORSA. Os genes *femA* e *mecA* têm sido identificados em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina (VANNUFFEL; GIGI; EZZEDINE et al., 1995). Genes regulatórios da transcrição do *mecA*, *mecI* e *mecIR* também são necessários para expressão da resistência (STAPLETON; TAYLOR, 2002)

O gene *mecA* está localizado em um cassete estafilocócico cromossomal (*Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* (SCC*mec*), composto por 7 subunidades genéticas SCC*mec I, II, III, IV, V, VI e VII* (SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007). O elemento *mec IV, V e VII* estão associados ao *S. aureus* resistente à oxacilina na

comunidade, os elementos *I*, *IV*, *V*, *VI* e *VII*, estão associados à resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, e os elementos *II* e *III* associados à resistência de múltiplas drogas (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; HIGUCHI; TAKANO; TENG et al., 2008; DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

Embora os clones de *S. aureus* resistente à oxacilina/meticilina (MRSA) tenham sido identificados a menos de 50 anos, esse microrganismo rapidamente se tornou o agente etiológico mais prevalente nos casos de infecções relacionadas à assistência em saúde em todo o mundo. Essa problemática não se limita apenas aos grandes hospitais dos países desenvolvidos. Estudo realizado entre países da América Latina (México, Argentina e Brasil) mostrou incidência média de 26,5% de MRSA como agente de infecção comunitária do trato respiratório, sendo este índice de 31,3% no Brasil (MENDES; MARIN; QUIÑONES et al., 2003). Os dados da *Pan American Health Organization* e da *Pan American Association of Infectious Diseases* também revelam que em muitos países da América Latina o índice de amostras de MRSA já ultrapassou os 40% (GUZMÁN-BLANCO; MEJÍA; ISTURIZ et al., 2009).

Em instituições em que esse micro-organismo é altamente endêmico, aproximadamente 1% de todos os pacientes hospitalizados se tornam colonizados e, 40 a 60% desenvolvem infecções por esse patógeno (BOYCE, 2001). Conforme Mimica e Mendes (2007), a princípio os MRSA eram próprios de ambientes hospitalares, porém a partir da década de 90 surgiram amostras de MRSA associados a infecções na comunidade (CA-MRSA). Primeiramente os CA-MRSA foram descritos em grupos minoritários como usuários de drogas, presidiários, esportistas (particularmente em jogadores de luta livre e futebol), crianças, militares e nativos americanos, posteriormente disseminando para a população geral (CHAMBERS, 2001).

Pesquisadores de diversos lugares têm relatado que os CA-MRSA possuem características singulares que os diferenciam dos MRSA nosocomiais. Baseados em variações da região regulatória do *mecA* nos *SCCmec*, nos tipos de recombinases do cassete cromossomal e nos determinantes de resistência adquiridos devido à integração de plasmídeos e transposons, pesquisadores constataram que os CA-MRSA estão associados a um tipo de *SSCmec*, não detectado no ambiente hospitalar, o *SCCmec IV* (RIBEIRO; DIAS; SILVA-CARVALHO et al., 2005; KUEHNERT; KRUSZON-MORAN; HILL et al., 2006). Demais autores pontuam que o CH-MRSA apresenta resistência a várias drogas, está associado à produção de várias toxinas, envolvido em infecções graves localizadas em vários sítios. O

CA-MRSA ao contrário, possui uma resistência reduzida aos antimicrobianos, produz poucas toxinas, e geralmente se encontra envolvido em infecções relacionados à pele e a tecidos moles (SAIID-SALIM; MATHEMA; KREISWIRTH, 2003).

Com relação aos demais antibióticos, Lowy (2003) afirma que mais de 90% dos isolados de estafilococos nosocomiais e comunitários são produtores de penicilinase e resistentes a outras classes antibióticas, como macrolídeos (eritromicina), estreptomicinas e tetraciclinas.

No que se refere à resistência à vancomicina (glicopeptídeo), foi no Japão, em 1996, que inicialmente ocorreu o surgimento de estirpes de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida a essa droga (VISA - siglas em inglês indicando *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina ou aos glicopeptídeos). Em 2002, nos Estados Unidos da América, foi isolada a primeira cepa resistente à vancomicina (VRSA - *S. aureus* Vancomicina Resistente) (MIMICA; MENDES, 2007; SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007). *S. aureus* resistentes à vancomicina também foram identificados no Brasil, em 2000, num hospital no Rio de Janeiro (SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007).

A resistência à vancomicina está relacionada com o gene *Van*, que propicia a resistência a esse glicopeptídeo em *Enterococcus* sp com a transmissão por meio de plasmídios ou pelo espessamento da parede celular, com a produção de maiores quantidades de peptideoglicano e de monômeros de mureína, dessa forma podendo causar resistência em *S. aureus* (SAIID-SALIM; MATHEMA; KREISWIRTH, 2003; CUI; IWAMOTO; LIAN et al., 2006; SANTOS, A.; SANTOS, D.; FREITAS et al., 2007). Nos *Enterococcus* sp já se encontra bem definido a presença dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC* havendo necessidade de mais estudos relacionados aos estafilococos.

### 3.5 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Para verificação do perfil de susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos vários testes laboratoriais *in vitro* podem ser realizados, tais como: o teste de disco difusão, de ágar diluição em meio sólido, ou líquido, para detecção da concentração inibitória mínima (CIM) e os E-test (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009a; ETM, 2008).

Os testes de sensibilidade são indicados para agentes causadores de doenças infecciosas que necessitem de terapia antimicrobiana, quando não é possível prever sua sensibilidade apenas com a identificação da bactéria e em especial para aqueles microorganismos pertencentes a uma espécie que é capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos usados na prática clínica. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam a droga, a alteração dos alvos de ação da droga e alteração da permeabilidade da membrana externa ou efluxo da droga. Alguns organismos possuem sensibilidade previsível a agentes antimicrobianos, e nesse caso a terapia empírica é amplamente reconhecida (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009a).

Com o teste de disco difusão pode ser conhecido se um organismo é sensível ou resistente a um determinado antibiótico, contudo este método não fornece qual o grau de resistência do organismo. O teste realizado com base apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem considerar o tamanho do halo, não é aceitável. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIMs), com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010). Vários são os antimicrobianos preconizados para a realização do Teste de Disco difusão para o *S. aureus* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

O teste de Agar diluição obtida usando a CIM pode mostrar qual a concentração do agente antimicrobiano necessária no sítio da infecção para inibir o crescimento do organismo infectante (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009b). O E-test também pode ser usado para identificação da sensibilidade de amostras. Nesse método, uma fita estreita de material plástico, que contém um gradiente com concentrações crescentes de antibiótico, deve ser colocada em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, semeada com o patógeno, de maneira semelhante ao teste de difusão em disco (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

### 3.6 ESTUDO GENOTÍPICO

As técnicas de tipagem molecular são importantes ferramentas que permitem diferenciar isolados com fenótipos idênticos, estabelecer rotas de disseminação, relacionar isolados de diferentes fontes, identificar cepas geneticamente diferentes e iguais dispersas no ambiente hospitalar (OLIVEIRA; LECASTRE, 2002; LIAO; STORCH; BILLER et al., 2006).

Com a utilização de métodos genotípicos é possível localizar genes específicos, bem como proceder a tipagem genética de organismos; tais métodos se baseiam na análise dos polimorfismos genéticos oriundos de inserções ou deleções de fragmentos, ou porções de DNA no cromossomo e extracromossômico, ou por mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios de restrição. Com a tipagem genética se pode identificar amostras tão semelhantes que se deduz serem procedentes de um único ancestral (clones) ou cepas bacterianas com perfil genético relacionado que são indistintas umas das outras (TENOVER, 1997).

Diversos métodos podem ser empregados para a caracterização genética de bactérias, a escolha deve ser feita se considerando o organismo-alvo, poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade de acesso ao método, interpretação e custos financeiros. Destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida na década de 90, que é baseada no princípio de replicação do DNA *in vivo*, realizado por meio de uma reação bioquímica *in vitro*, a qual permite que o DNA de uma região selecionada do genoma de um organismo seja amplificado milhares de vezes, selecionando de maneira efetiva essa porção de DNA do restante do genoma (ALBERTS et al., 2004). A técnica permite iniciar a reação com quantidades mínimas de DNA e terminar com grandes quantidades de uma sequência-alvo. A PCR é uma técnica importante para estudos genético-moleculares devido a sua facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Para que ocorra a PCR é preciso: DNA, iniciador ou “*primer*” ou oligonucleotídeos de cadeia simples, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação, MgCl<sub>2</sub>, DNA-polimerase termoestável “*Taq* DNA polimerase” e água. Esses reagentes, calculados para cada reação são depositados no termociclador automatizado e computadorizado (KONEMAN et al., 2001). A técnica de PCR envolve um ciclo com três etapas: a desnaturação, o anelamento e a extensão. O recipiente contendo a amostra é submetido a uma elevada temperatura, geralmente 94°C,

para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é diminuída a 50-65°C quando, então, os *primers* têm a oportunidade de se anelarem às suas sequências complementares no DNA genômico. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 72°C, temperatura ideal para que a DNA-polimerase utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias (FARAH, 1997).

Ao final de 30 ciclos da reação, a amplificação ocorre de maneira exponencial, com a produção de mais um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência específica do DNA (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004). Os *primers* utilizados nas reações são produzidos artificialmente, de modo que suas sequências de oligonucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região-alvo, possibilitando o início da síntese pela DNA-polimerase na região desejada (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004). Existem inúmeros *primers* de sequência repetitiva que podem ser utilizados e o oligonucleotídeo RW3A é uma alternativa. Os produtos amplificados podem ser visualizados como bandas ou fragmentos, por meio de eletroforese (DEL VECCHIO; PETROZIELLO; GRESS et al., 1995).

### 3.7 TIPAGEM HLA

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) consiste em um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossomo 6 humano. O CPH contém um grupo de genes que codificam diversas proteínas que são expressas na superfície de vários tipos celulares. Muitos desses genes estão envolvidos em funções imunológicas. Nos seres humanos, tais moléculas são conhecidas como Antígenos Leucocitários Humanos, ou sistema HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigens* (PEAKMAN; VERGANI, 1999).

As moléculas do sistema HLA são classificadas em moléculas classe I (HLA-A, -B e -C), classe II (HLA-DR, -DQ e -DP) e classe III. Tais moléculas são glicoproteínas altamente polimórficas, sendo descritos 767 alelos para o locus A, 1178 para o locus B e 618 para o locus DRB1 (EBI, 2009), e se diferenciam entre si quanto à localização em tecidos e funções. As moléculas classe I são localizadas na superfície de todas as células nucleadas do

organismo e têm como função apresentar peptídeos às células T citolíticas (CD8+). As moléculas classe II possuem distribuição mais restrita no organismo, sendo localizadas na superfície de células que estão diretamente relacionadas à resposta imune, tais como macrófagos, monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, linfócitos B e linfócitos T ativados, elas têm como função apresentar peptídeos às células T auxiliares (CD4+). Portanto, as moléculas classe I e classe II estão envolvidas na imunomodulação da resposta imune, por sua função no reconhecimento e apresentação de peptídeos próprios, tumorais ou de microorganismos infecciosos às células T, permitindo que o sistema imune diferencie o próprio do não-próprio. A região classe III não codifica moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, como os fatores de necrose tumoral, as proteínas C4, C2 e o fator B do sistema complemento, a proteína do choque térmico e as enzimas 21-hidroxilase (PAMER; CRESSWELL, 1998; NAVARRETE 2000; TURNER 2004; ALVES; VIEIRA; MEYER et al., 2006).

Devido a sua presença em todas as células do organismo, as moléculas HLA funcionam como aloantígenos, sendo considerado um potente marcador de sobrevivência em transplantes, tendo função de destaque entre os sistemas biológicos relacionados ao processo de rejeição de enxertos (KRENSKY; WEIS; CRABTREE et al., 1990; ERLICH; OPELZ; HANSEN, 2001) A identificação dessas moléculas permite a escolha do melhor par doador-receptor, conforme o grau de compatibilidade entre ambos. A histocompatibilidade é mandatória para o sucesso do transplante, mesmo com o uso de drogas imunossupressoras que reduzem a possibilidade de rejeição (BICALHO; RUIZ; COSTA et al., 2002).

As moléculas do sistema HLA podem ser identificadas por meio de métodos sorológicos, celulares e de biologia molecular. O método sorológico clássico é o da microlinfocitotoxicidade de Terasaki (TERASAKI; MCCLELLAND, 1964), no qual a citotoxicidade mediada por anticorpos e dependente do complemento possibilita a detecção de antígenos leucocitários e, a partir daí, a definição de antígenos e alelos HLA (DONADI, 2000). Nesse método, um anticorpo anti-HLA conhecido é adicionado a linfócitos T (moléculas HLA-A, B, C) ou a linfócitos B (HLA-DR e DQ). Após a reação antígeno-anticorpo ter ocorrido, a lise celular, promovida pela incubação com o complemento, indica uma reação positiva (DONADI, 2000).

O método celular, denominado cultura mista de linfócitos, utiliza células com fenótipo conhecido para chegar à definição de especificidades HLA. Nesse método, linfócitos do paciente, com tipificação a ser determinada, são colocados em cultura com linfócitos de

tipificação conhecida. Se houver proliferação de linfócitos, entende-se que existem diferenças antigênicas entre os dois indivíduos, ao passo que a não proliferação indica que eles apresentam as mesmas especificidades (DONADI, 2000).

Os métodos de biologia molecular avaliam fragmentos de DNA extraídos de células nucleadas (como sangue periférico, cabelo, osso) e amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os dois métodos mais utilizados são o SSP (*sequence specific primers*), que utiliza reações de amplificação com par de iniciadores capazes de reconhecer alelos ou grupos de alelos, e o SSOP (*sequence specific oligonucleotide probes*), no qual o DNA amplificado é hibridizado com sondas de oligonucleotídeos para reconhecer os alelos ou grupos de alelos (DONADI, 2000).

As moléculas HLA estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T e relacionadas à rejeição de enxertos, além disso, sua determinação é importante para a compreensão de mecanismos associados à suscetibilidade ou resistência a determinadas doenças (CAILLAT-ZUCMAN, 2008).

Os primeiros estudos realizados referentes à associação entre os antígenos de histocompatibilidade iniciaram na década de 60, no entanto não foi obtido êxito nos resultados (WALFORD; FINKELSTEIN; NEERHOUT, 1970). Já em meados dos anos 70, foi verificada associação do antígeno HLA-B27 com a espondilite anquilosante (SCHLOSSTEIN; TERASAKI; BLUESTONE et al., 1973). A partir de então, pesquisadores vêm buscando identificar associações entre os antígenos HLA e uma grande variedade de doenças com diferentes etiologias, como as autoimunes, as infecciosas, as neoplásicas e as idiopáticas, e até mesmo identificar antígenos HLA que conferem proteção a certas doenças (DONADI, 2000).

Diferentes especificidades HLA podem ser mais frequentes em indivíduos com determinadas doenças e a caracterização dessas moléculas podem ter importantes implicações clínicas (NEUSTADT, 1977; SINGH; KAUL, R.; KAUL, A. et al., 2007; JACOBSON; HUBER; TOMER et al., 2008). Todavia, conforme Donadi (2000), poucos trabalhos brasileiros têm sido publicados no que tange a essa temática. Poucos também são as pesquisas sobre a correlação entre a tipagem HLA das diferentes etnias populacionais e a condição de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus*.

A ocorrência de associação entre moléculas HLA e uma doença é avaliada pela comparação das frequências dos antígenos em pacientes e indivíduos-controle (sadios), sendo a significância estimada pelo teste exato de Fisher ou pelo Chi-quadrado. A força da

associação é calculada pelo risco relativo (RR), pela fração etiológica (FE) ou pela fração preventiva (FP). O RR indica quão mais frequente uma doença ocorre em indivíduos portadores de um determinado antígeno HLA em relação aos indivíduos que não apresentam o marcador (SVEJGAARD, 1986; SVEJGAARD; RYDER, 1994).

Após a verificação da associação entre um antígeno HLA com uma determinada doença, buscam-se hipóteses para se compreender os possíveis mecanismos implicados nessa associação. Várias suposições existem, entre elas estão o fato de as moléculas de histocompatibilidade funcionarem como receptores para alguns agentes etiológicos, facilitando ou impedindo a entrada de um microorganismo na célula; as moléculas HLA selecionam o peptídeo antigênico a ser apresentado ao linfócito T, uma mesma molécula pode se ligar a peptídeos distintos com afinidades diferentes; pode ocorrer o mimetismo molecular entre os antígenos HLA e os agentes etiológicos; indução aberrante de expressão das moléculas HLA de classe II, fazendo com que essas células apresentem aos linfócitos T antígenos resultantes da degradação do próprio tecido, como ocorre nas doenças autoimunes; pode estar envolvido também a participação de outros genes do CPH, ou mesmo de fora do CPH, que estejam em desequilíbrio de ligação com os genes de histocompatibilidade. Da mesma maneira que os genes de classe I podem estar em desequilíbrio de ligação com os de classe II, é possível que também haja um desequilíbrio com os outros genes de fora do CPH (SVEJGAARD; PLATZ; RYDER et al., 1975; TIWARI; TERASAKI, 1985; LECHLER, 1994a; LECHLER, 1994b; BRODSKY, 1997).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Estudo descritivo, exploratório e correlacional, no qual a coleta do material biológico foi realizada no serviço de Diálise da Santa Casa de Maringá e a etapa microbiológica posterior no Laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Estadual de Maringá.

O serviço de Diálise do referido hospital possuía aproximadamente 130 pacientes em diálise e 57 pacientes transplantados renais no período da coleta do material. A população desta pesquisa foi composta por 111 pacientes em diálise e 48 transplantados renais, totalizando 159 pacientes. Dos pacientes em diálise, 54% (60/111) eram do sexo masculino e 45,9% (51/111) do sexo feminino e a idade variou entre 15 e 93 anos. Já dos pacientes transplantados renais 64,5% (31/48) eram do sexo masculino e 35,4% (17/48) do sexo feminino e a idade variou entre 18 e 64 anos. A coleta do material biológico se deu no período de junho a novembro de 2009, sendo realizada apenas uma coleta por paciente.

Participaram da pesquisa os pacientes que concordaram e que compareceram na data de agendamento para realização da coleta. Foram incluídos aqueles que no momento da amostragem não apresentavam sinais e sintomas clínicos de infecção, como febre, tosse produtiva e coriza. Os pacientes foram orientados no que tange aos objetivos da pesquisa e foram esclarecidos quanto ao anonimato e sobre dúvidas, para posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A).

### 4.2 PROCEDIMENTOS

#### 4.2.1. Coleta de material biológico

Foram utilizadas amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de pacientes submetidos a tratamento dialítico e transplantados renais, obtidos meio da fricção

de um *swab* estéril nas narinas. Posteriormente, os *swabs* foram transferidos para tubos contendo caldo de Soja Trypticaseína/Trypticase Soy Broth (TSB), enriquecido com 6,5% de Cloreto de Sódio, e acondicionados em estufa a 37° C por 24 horas.

#### 4.2.2 Semeadura e identificação

Isolamento e identificação de *S. aureus*: o material dos vestibulos nasais, depois de transferido para um tubo contendo TSB acrescido de 6,5% de NaCl, com crescimento de 24 horas em estufa (DIAS FILHO; ABREU FILHO; CARDOSO et al., 2001), foi semeado na superfície de placas de Petri (90X15mm) contendo Agar Manitol Salgado (AMS) (Becton Dicksenson and Company, BD Diagnostic Systems, USA). Após 24-48 horas de incubação a 37°C, as colônias suspeitas de pertencerem a *S. aureus* foram submetidas à Coloração de Gram e leitura em microscopia de imersão (TOLEDO, 1989) e aquelas identificadas como cocos Gram positivo agrupados em forma de cachos de uva foram transferidas para TSB adicionado 6,5% de NaCl. Após seis horas de incubação foi realizado o Teste de Coagulase em tubo conforme Koneman et al. (2008).

Para o teste da coagulase, utilizou-se plasma de coelho liofilizado (Coagulo-Plasma LB, Laborclin produtos para laboratório Ltda., Pinhais Paraná, Brasil), acrescido da amostra e incubado em temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  sendo as leituras realizadas em 30 minutos, 4 horas, 12 horas e 24 horas. As amostras foram consideradas positivas após formação de um coágulo. No teste da coagulase foi utilizada amostra controle 25923 de *S. aureus* da *American Type Culture Collection* (ATCC).

#### 4.2.3 Estocagem

Posteriormente aos testes de identificação, as amostras foram semeadas em placas contendo Agar Mueller Hinton (AMH) (Becton Dicksenson and Company, BD Diagnostic Systems, USA) e incubadas por 48 horas em estufa a 37° C. Essas placas, após o período de

crescimento, foram raspadas com alças e as colônias estocadas em um meio TSB com glicerol (20%), e congeladas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para estudos posteriores.

#### 4.3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

##### 4.3.1 Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de Agar diluição para oxacilina e vancomicina, conforme o documento M7-A8 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009b). As concentrações testadas iniciaram em 256  $\mu\text{g/ml}$  para a oxacilina até 0,06  $\mu\text{g/ml}$  e 32  $\mu\text{g/ml}$  para a vancomicina a 0,06  $\mu\text{g/ml}$ ; um controle positivo foi utilizado (ATCC 43300). O cálculo das concentrações das soluções-estoque foi feito a partir da maior concentração testada para o antimicrobiano, do volume de ágar Mueller-Hinton utilizado nas placas de Petri e do volume final da solução-estoque. A quantidade em miligramas do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque (mg/mL)}}{\text{Potência do antibiótico}(\mu\text{g/mL})}$$

Após o preparo, as soluções-estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore<sup>®</sup> de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro e estocada. Utilizou-se, para diluição do antimicrobiano, água estéril. A solução-estoque foi a primeira diluição a ser usada e a partir dela foram feitas diluições 1:2 até atingir a menor concentração.

Para a realização do experimento foi utilizado ágar Mueller-Hinton diluído e em quantidade suficiente para todas as diluições dos antimicrobianos, segundo especificações do fabricante. Após o preparo, foram distribuídos 19 mL de ágar em cada tubo, sendo esterilizados em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos e posteriormente resfriados em banho-maria até atingirem a temperatura de aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$ , para que não ocorresse a degradação do antibiótico. Em cada tubo contendo 19 mL de ágar foi adicionado 1 mL do antimicrobiano, totalizando um volume de 20 mL, necessário para atingir a espessura de 4-5

mL de meio na placa. O tubo foi homogeneizado e o ágar distribuído em placas de Petri numeradas com suas respectivas concentrações.

As amostras a serem testadas foram anteriormente submetidas à incubação por 24 horas em AMH. A preparação do inóculo foi realizada a partir dessa placa e foi utilizada como parâmetro uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Após a transferência de 100 µl de cada amostra para um tubo contendo 900 µl de ágar Miller-Hinton, foram distribuídos, a partir desse último tubo, 200 µl de cada suspensão bacteriana em placas de Elisa de 96 poços.

Com o auxílio de um aplicador de 28 pinos, inicialmente inoculamos as amostras em placa-controle sem antimicrobiano, para verificarmos a viabilidade das amostras, e na sequência as inoculamos nas demais placas, com concentração crescente do antimicrobiano. No final da série de diluição os isolados foram inoculados em uma placa-controle sem antimicrobiano, para se avaliar a contaminação e o carreamento significativo da amostra durante o procedimento.

Após 30 minutos de secagem as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Utilizou-se como controle de qualidade para esse teste a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 43300. A leitura do teste foi feita conforme os cortes descritos na Tabelas 2C do documento M100-S20 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

#### 4.3.2 Teste de disco difusão

O teste de disco difusão foi realizado utilizando as normas recomendadas pelo documento M2-A10 do Clinical and Laboratory Standards Institute (2009a), sendo assim, os antimicrobianos utilizados foram: Oxacilina 1 µg, Cefoxitina 30 µg, Gentamicina 10 µg, Telitromicina 15 µg, Tetraciclina 30 µg, Linezolid 30 µg, Penicilina G 10 µg, Azitromicina 15 µg, Clindamicina 2 µg, Trimetropim /sulfametoxazol 75 µg, Doxicilina 30 µg, Rifampicina 5 µg, Teicoplanina 30 µg, Ofloxacina 5 µg.

Primeiramente foi preparada uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland, a qual foi inoculada na superfície do meio de ágar Mueller-Hinton, em seguida os discos foram depositados sobre a placa com uma pinça estéril com uma determinada distância entre eles. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. O

controle de qualidade dos discos de antimicrobianos e do meio de cultura foi realizado para cada lote por meio da cepa *S. aureus* ATCC 25923, e os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na Tabela 2C do documento M100-S20, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2010).

#### 4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

##### 4.4.1 Extração de DNA

Para o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os diferentes *primers*, a extração de DNA das amostras de *S. aureus* foi realizada com Cetyl Trimethylammonium Bromide (CTAB), conforme metodologia proposta por Doyle e Doyle (1990). As amostras foram plaqueadas em AMH, e após incubação de 24-48 horas em estufa a 37°C, as colônias foram transferidas para um *ependorf* contendo 200 µl de Tris-EDTA (TE) e centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet*, suspenso em 600 µl de CTAB e 40 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (CIA), em seguida foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 minutos, para que ocorresse a lise da parede bacteriana. Após esse período foi adicionado 800 µl de CIA, o *ependorf* foi agitado gentilmente por inversão e centrifugado a 12000 rpm por 5 min.

Aproximadamente 500 µl do sobrenadante foram transferidos para outro *ependorf*, com o mesmo volume de isopropanol gelado, e deixado em *overnight* em freezer a -20°C para a precipitação do DNA. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos, a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi eliminado, acrescentado 500 µl de etanol a 70% gelado e realizada nova centrifugação. Posterior a eliminação do etanol e secagem dos tubos de *ependorf* foram acrescentados 200 µl de TE e armazenados em freezer a -20°C. O DNA genômico foi identificado por eletroforese em gel de agarose a 2% por 40 minutos a 100 volts.

#### 4.4.2 Genotipagem com o *Primer RW3A*

A tipagem genética das amostras de *S. aureus* foi realizada por meio da PCR com o *primer RW3A* com a seguinte sequência 5'- TCGCTCAAACAACGACACC 3', conforme metodologia proposta por Van Belkun, Kluytmans, Van Leeuwen et al. (1995) e reproduzida por Reinoso, Bettera e Odierno et al. (2007), com algumas modificações.

A reação de amplificação foi calculada para 25 µl para cada amostra sendo, 16,3 µl de água Milli Q estéril, 2,5 µl de tampão 10X PCR (10 mM Tris HCl [pH8.8]), 1,5 µl de *primer* a 50 mM, 0,2 µl de Taq polimerase (5U/µl), 1,0 µl de DMSO a 2,5%, 0,5 µl de dNTP (10 mM), 1,0 µl de MgCl (50 mM) e 2,0 µl de DNA diluído e conservado em TE. A amplificação foi feita em termociclador programado com 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 2 minutos a 72°C e finalizando com extensão de 5 minutos a 72°C e mantido a 4°C. A análise do produto de amplificação foi feita após corrida em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo, por 2 horas e 40 minutos e utilizado Ladder 100 pb para comparação dos produtos amplificados, separação e quantificação das bandas.

A análise dos padrões de bandas na genotipagem foi realizada visualmente pelo gel, sendo que o programa NTSYS foi empregado para se avaliar o grau de similaridade das amostras por meio da construção do dendograma. Primeiramente os dados foram colocados em tabela simples do programa Excel e posteriormente os dados transferidos para o programa NTSYS que gerou o dendograma.

A análise destes ocorreu em três fases distintas. A primeira etapa da análise foi feita visualmente pelo pesquisador, a segunda foi realizada por outra pesquisadora e a terceira etapa se constituiu em cruzar as informações das duas primeiras etapas, para se averiguar a homogeneidade dos dados obtidos pelos pesquisadores no que tange à similaridade das amostras em estudo.

#### 4.4.3 Identificação do gene *mecA*

A identificação do gene *mecA* das amostras resistentes à oxacilina foi realizada por PCR conforme metodologia proposta por Serhat, Hoskins, Flokonits et al. (1992) e Siripommongcolchain et al. (2002), com algumas alterações. Os *primers* utilizados foram: MRS1- 5' TAGAAATGACTGAACGTCCG 3' e MRS2- 5'TTGCGATCAATGTTACCGTAG 3'. Para a reação de amplificação com 25 µl foram utilizados os seguintes reagentes em suas respectivas quantidades: 12,1 µl de água Milli Q estéril, 2,5 µl de tampão 10X PCR (10 mM Tris HCl [pH8.8]), 1,5 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM), 1,5 µl de dNTP (10 mM), 2 µl de cada *primer* (50mM), 0,4 µl de Taq polimerase (5U/µl) e 3,0 µl de DNA de cada amostra.

A amplificação se deu em termociclador com o seguinte programa: 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e por fim, 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. A corrida foi realizada a 100 watts por um período de 60 minutos, com posterior visualização e fotografia em luz ultravioleta. O amplicom de cada amostra foi de 154 pares de base (pb), sendo comparado com Ladder 100 bp. Como controle positivo foi utilizado a cepa *S. aureus* ATCC 33591 por expressar o gene.

#### 4.5 Tipagem HLA

##### 4.5.1 Extração de DNA humano

Amostras contendo 10 mL de sangue periférico foram coletadas por punção venosa com tubos a vácuo e anticoagulante EDTA e centrifugada a 2500rpm durante 15 minutos, para obter a camada leucocitária. O DNA genômico foi extraído dessa camada pelo reagente EZ-DNA, seguindo as instruções do fabricante (Biological Industries, Kibbutz Beit, Haemek).

#### 4.5.2 Polimorfismo genético das moléculas HLA

O estudo do polimorfismo genético das moléculas HLA foi realizado no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para a tipificação HLA foi utilizado o kit LABType® SSO One Lambda aliado à tecnologia Luminex. Esse método de PCR utiliza *primers* biotinilados. O material amplificado passa por um processo de desnaturação e posterior hibridização com sondas ligadas a microesferas (*beads*), que fazem parte do sistema multianalítico Luminex. Cada *bead* é marcada com uma determinada fluorescência e possui uma sonda de oligonucleotídeo correspondente a um alelo HLA ou a um grupo de alelos HLA. Após a etapa de hibridização, as sondas que hibridizaram com o DNA são marcadas com uma solução SAPE (estreptavidina conjugada com ficoeritrina). O citômetro de fluxo LABScan 100 é capaz de reconhecer a fluorescência da *bead* e da SAPE ligada à sonda. Os dados gerados pelo aparelho foram analisados no software HLA Fusion para a determinação da tipagem HLA.

#### 4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise dos dados foi realizada se utilizando os métodos de proporções, frequências simples, teste exato de Fisher e qui-quadrado.

#### 4.7 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo obedeceu e respeitou todos os preceitos contidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, que disciplina as pesquisas com Seres Humanos. O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP) da UEM, sob o parecer 212/2009 (BRASIL, 1996) (ANEXO A).

No momento da coleta do material, todos os participantes foram informados e esclarecidos sobre os objetivos e métodos da pesquisa e, mediante sua concordância em participar, foi solicitada a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias. Uma das vias ficou de posse da pesquisadora e a outra foi entregue ao participante.

## 5 ARTIGOS

### 5.1 ARTIGO 1

#### **FREQUÊNCIA DE CARREAMENTO, ASPECTOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PACIENTES EM DIÁLISE E TRANSPLANTADOS RENAIIS EM UM HOSPITAL DO NORTE DO PARANÁ.**

Luciana Borges Giarola<sup>1</sup>  
Rosiane Ribeiro dos Santos<sup>2</sup>  
Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>3</sup>  
Sueli Donizete Borelli<sup>4</sup>  
João Bedendo<sup>5</sup>

#### **RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* entre pacientes submetidos a tratamento dialítico e transplantados renais, identificar o perfil de resistência aos antimicrobianos e verificar o perfil genético utilizando o oligonucleotídeo RW3A. O estudo envolveu 159 indivíduos, sendo 111 pacientes em diálise e 48 transplantados renais. Dos 48 transplantados, 75% apresentaram positividade para *S. aureus*, enquanto que entre os 111 em diálise, 49% foram carreadores. Duas amostras tiveram resultados divergentes para a oxacilina entre os testes de disco difusão e concentração inibitória mínima (CIM). Ambas apresentaram sensibilidade ao teste de disco difusão e resistência ao CIM (4µg/ml). No antibiograma, por disco difusão, observou-se que 10 amostras foram resistentes à cefoxitina, das quais 8 também foram resistentes à oxacilina. As 10 amostras resistentes à cefoxitina pelo sistema de disco difusão tiveram essa resistência

---

<sup>1</sup> Enfermeira. Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Endereço para correspondência: Rua Osvaldo Cruz, 317, apto 201, Zona 07, Maringá, Paraná, Brasil. Telefone: 44-3034-8658. E mail: [lu\\_giarola@hotmail.com](mailto:lu_giarola@hotmail.com)

<sup>2</sup> Enfermeira. Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da UEM.

<sup>3</sup> Farmacêutica bioquímica. Doutor em Microbiologia. Docente do departamento de Microbiologia da UEM.

<sup>4</sup> Farmacêutica bioquímica. Doutora em Imunologia. Docente do departamento de imunologia da UEM.

<sup>5</sup> Enfermeiro. Doutor em Enfermagem. Docente do departamento de enfermagem da UEM.

confirmada com o CIM. Das 10 amostras oxa-resistentes, 8 apresentaram o gene *mecA*. Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, a maioria foi resistente à penicilina e mostraram altas taxas de resistência aos demais antimicrobianos. Para a tipagem genética, um perfil mais homogêneo foi encontrado entre as amostras dos pacientes em diálise. Entre as amostras com alto percentual de similaridade não se observou qualquer correlação com a sensibilidade ou resistência à oxacilina. Considerando-se os resultados deste estudo, recomenda-se a implementação de medidas de prevenção e controle, entre as quais, maior rigor na prescrição de antimicrobianos e descontaminação nasal na iminência de procedimentos de risco.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, carreamento nasal, resistência, gene *mecA*, tipagem genética.

## INTRODUÇÃO

A colonização nasal por *Staphylococcus spp* inicia logo após o nascimento, aumenta na infância e diminui na vida adulta (9). Indivíduos colonizados podem desenvolver infecções endógenas, causadas por cepas disseminadas a partir da nasofaringe, constituindo 80% dos casos de infecções invasivas por *Staphylococcus aureus*. Aproximadamente 20% da população adulta é carreadora de *S. aureus* na nasofaringe, outros 30% carregam intermitentemente e 50% não são carreadores (39).

Pacientes submetidos à diálise e transplantados renais têm sido acometidos por infecções e, entre os patógenos mais prevalentes, destacam-se os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos* (1, 15). Esses pacientes apresentam fatores de risco para a colonização ou infecção pelo *S. aureus* multirresistente, visto que estão em uso constante e prolongado de antimicrobianos, são submetidos a constantes interações em ambiente hospitalar e procedimentos invasivos, mantêm contato com pacientes e profissionais

colonizados. Pacientes transplantados renais possuem ainda risco adicional devido ao uso de imunossupressores a que são submetidos logo após o transplante (17, 30).

*Staphylococcus aureus* têm como característica marcante uma alta versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos, especialmente às drogas betalactâmicas, como a oxacilina (4). Essa resistência é codificada pelo gene *mecA* que se situa em um *Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* (SCC*mec*), o qual confere resistência à oxacilina é tranferível entre espécies de *Staphylococcus sp* (11). Outros mecanismos de resistência, além do gene *mecA*, podem estar envolvidos como degradação enzimática dos antimicrobianos, alteração na permeabilidade da membrana e alteração no sítio ativo (5).

Entre as diferentes técnicas moleculares empregadas para estudo bacteriano, destaca-se a técnica da “Reação em Cadeia da Polimerase” (PCR), com a utilização de *primers* específicos (35). Por meio dessa técnica é possível detectar genes de resistência antimicrobiana, diferenciar amostras com fenótipos idênticos, estabelecer rotas de disseminação, relacionar isolados de diferentes fontes e comparar o genótipo de amostras dispersas no ambiente (22).

A técnica de PCR, utilizando-se de sequências repetitivas (REP\_PCR), pode ser empregada para melhor se compreender as relações evolutivas entre os clones de *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA) (21), bem como rastrear e identificar a fonte de transmissão. O oligonucleotídeo RW3A é uma sequência repetitiva utilizada para estudos com *S. aureus* e possibilita a distinção genética de cepas fenotipicamente iguais (29).

Considerando a importância do carreamento nasal de *S. aureus* na epidemiologia da infecção estafilocócica e tendo em vista que um percentual importante dessas infecções é de origem endógena (25), propusemos este estudo com os seguintes objetivos: investigar a frequência de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* entre pacientes submetidos a tratamento dialítico e transplantados renais; identificar o perfil de

resistência às drogas antimicrobianas usualmente empregadas na terapêutica; identificar a presença do gene *mecA* das amostras resistentes à oxacilina; identificar o perfil genético das amostras e correlacionar os achados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Local e população de estudo**

Estudo descritivo, exploratório e correlacional, no qual se envolveu os pacientes que frequentam o serviço de diálise da Santa Casa de Maringá, incluindo aqueles em tratamento dialítico e transplantados renais. A população foi composta por 111 pacientes em diálise e 48 transplantados renais, totalizando 159 indivíduos. Dos pacientes em diálise, 54% (60/111) eram do sexo masculino, 45,9% (51/111) do sexo feminino e a idade variou entre 15 e 93 anos. Entre os pacientes transplantados renais, 64,5% (31/48) eram do sexo masculino, 35,4% (17/48) feminino e a idade variou entre 18 e 64 anos. A coleta do material biológico se deu no período de junho a novembro de 2009, sendo realizada apenas uma coleta por paciente.

### **Procedimentos laboratoriais**

- Coleta de material biológico, identificação e estocagem

O material biológico dos vestibulos nasais foi obtido com auxílio de *swab* estéril, que foi posteriormente acondicionado em tubo contendo Trypticase Soy Broth (TSB) acrescido de 6,5% de NaCl, incubado por 24 horas em estufa e a seguir semeado em placa de Petri contendo Agar Manitol Salgado (AMS) (Becton Dicksenson and Company, BD Diagnostic Systems, USA) (12). Após 24-48 horas de incubação a 37°C, as colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à Coloração de Gram (36) e aquelas identificadas como cocos Gram positivo agrupadas em cachos foram submetidas ao teste de coagulase em tubo

(20). Posteriormente a identificação, as amostras foram estocadas em meio TSB acrescido de glicerol (20%) e congeladas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Suscetibilidade aos antimicrobianos**

- Teste de disco difusão

O teste de disco difusão foi realizado seguindo-se as normas recomendadas pelo documento M2-A10 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (5), sendo que os antimicrobianos testados foram: Oxacilina 1  $\mu\text{g}$ , Cefoxitina 30  $\mu\text{g}$ , Gentamicina 10  $\mu\text{g}$ , Tetraciclina 30  $\mu\text{g}$ , Penicilina G 10  $\mu\text{g}$ , Azitromicina 15  $\mu\text{g}$ , Clindamicina 2  $\mu\text{g}$ , Trimetropim /sulfametoxazol 75  $\mu\text{g}$ , Doxicilina 30  $\mu\text{g}$ , Rifampicina 5  $\mu\text{g}$ , Teicoplanina 30  $\mu\text{g}$ , Ofloxacina 5  $\mu\text{g}$ . Foram utilizadas amostras de cepas controle de *S. aureus* da American Type Culture Collection (ATCC), sendo uma sensível (ATCC 25923) e uma resistente à oxacilina (ATCC 43300). Os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na Tabela 2C, M100-S20, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (6). Resultados de leitura interpretados como intermediário foram considerados como resistentes.

- Teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada por meio do método de Agar diluição para oxacilina e vancomicina de acordo com metodologia proposta pelo documento M7-A8 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (7). As amostras ATCC 29213 e 43300 foram utilizadas como controle positivo. A leitura do teste foi feita conforme os cortes descritos na Tabelas 2C do documento M100-S20 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (6).

### **Reação em Cadeia da Polimerase**

- Extração de DNA

Para o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os diferentes *primers*, a extração de DNA das amostras de *S. aureus* foi realizada com Cetyl Trimethylammonium Bromide (CTAB) (13).

#### - Identificação do gene *mecA* e genotipagem

A identificação do gene *mecA* das amostras resistentes à oxacilina foi realizada utilizando-se os primers MRS1- 5' TAGAAATGACTGAACGTCCG 3' e MRS2- 5'TTGCGATCAATGTTACCGTAG 3'(33,37). Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. Um amplicom de 154 pares de base (pb) indicou a presença do gene *mecA*.

A tipagem genética das amostras foi realizada por meio da PCR com o *primer* RW3A com a seguinte sequência 5'- TCGCTCAAACAACGACACC 3' (38). O produto amplificado foi analisado após corrida em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. A análise dos padrões de bandas foi realizada visualmente e o grau de similaridade entre as amostras foi obtido com o uso do programa NT SYS. O grau de similaridade é demonstrado através de um dendograma.

#### **Aspectos éticos**

Este estudo obedeceu e respeitou todos os preceitos contidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP) da UEM, sob o parecer 212/2009 (3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 48 transplantados renais, 36 (75%) apresentaram positividade para *S. aureus* em seus vestíbulos nasais enquanto que entre os 111 em diálise, 55 (49%) foram carreadores. Essas altas taxas de carreamento nasal são compatíveis com dados da literatura que têm mostrado taxas semelhantes (27). Palos (28), estudando profissionais da área da saúde, encontrou uma prevalência de 84,7% para *S. aureus*. Na população geral, uma taxa média de 37,2% foi obtida por Kluytmans et al. (22), os quais referem valores maiores entre pacientes que eram submetidos repetidamente à punção de pele, como os pacientes em hemodiálise ou diálise peritoneal ambulatorial contínua – CAPD. Uma vez que o carreador dessa bactéria parecer ser preditor de infecção, faz-se necessária sua identificação como estratégia de prevenção (16).

Por meio do antibiograma, pelo sistema de disco difusão, observou-se que 10 amostras foram resistentes à cefoxitina, das quais 8 também foram resistentes à oxacilina. O CLSI (6) recomenda que os resultados da resistência à oxacilina sejam cruzados com aqueles obtidos para cefoxitina, visto que a leitura deste é mais precisa e fidedigna. A identificação de resistência à oxacilina é epidemiologicamente importante, pois essa droga é um marcador de resistência intrínseca para outros grupos de antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas (24).

A taxa de resistência encontrada para a oxacilina (11%) e a total sensibilidade à vancomicina correspondem aos resultados obtidos por Faria (14). O resultado de sensibilidade plena à vancomicina obtido neste estudo era esperado na medida em que, no Brasil, poucos trabalhos têm relatado o isolamento de amostras resistentes a esta droga (31). Em relação aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina pesquisas têm alertado para a necessidade de políticas de restrição de uso, evitando, dessa forma, seu emprego inadequado

ou desnecessário e reduzindo a chance de surgimento e disseminação de cepas resistentes, ou com sensibilidade reduzida (8).

Observou-se 100% de sensibilidade à teicoplanina, aproximadamente 90% de resistência à penicilina, 14% para rifampicina e 59% para azitromicina. Alta taxa de resistência de *S. aureus* à penicilina tem sido observada desde 1959 quando essa frequência era de 80%, sendo estendida tanto à amoxicilina como à ampicilina (23). Os resultados de resistência para rifampicina (14%), gentamicina (19%) e a total sensibilidade à teicoplanina obtidos neste estudo são semelhantes aqueles encontrados por Menegoto e Picoli (26). Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo sistema de disco difusão das amostras de *S. aureus* isolados de pacientes em diálise e transplantados renais da Santa Casa de Maringá, 2009, são mostrados na Tabela 1.

O teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado para confirmação da resistência à oxacilina obtida por disco difusão e testar a resistência à vancomicina. As 10 amostras resistentes à cefoxitina pelo sistema de disco difusão tiveram esta resistência confirmada com o CIM, variando entre 4 e 256 µg/ml. Cerca de 30% (3/10) das amostras apresentaram CIM de 4 µg/ml, 10% (1/10) CIM de 8 µg/ml, 20% (2/10) CIM de 16 µg/ml e 40% (4/10) CIM de 256 µg/ml. Duas amostras tiveram resultados divergentes com relação à oxacilina entre os testes de disco difusão e CIM. Ambas apresentaram sensibilidade ao teste de disco difusão e resistência ao CIM com valores iguais ao ponto de corte de 4µg/ml. Esses resultados corroboram a proposição do CLSI (5), que preconiza a necessidade de se correlacionar os resultados dos testes de disco difusão com os resultados do teste da CIM, empregando-se cepas-padrão (ATCC) reconhecidamente sensíveis e resistentes.

Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana mostraram que das 10 amostras resistentes à oxacilina pelo CIM, 6 (60%) apresentaram CIM de 2µg/ml para

vancomicina e 4 (40%) CIM de 1 µg/ml, sendo todas classificadas como sensíveis. Cruzando-se os resultados do teste de sensibilidade (CIM) obtidos para oxacilina e para vancomicina não se observou qualquer associação, independente dos valores obtidos, pois todas as amostras se mostraram sensíveis a última droga. O perfil de resistência aos antimicrobianos das dez amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina isolados de pacientes em diálise (D) e transplantados renais (T) da Santa Casa de Maringá, 2009, é mostrado na tabela 02.

A resistência aos antimicrobianos pelo *S. aureus* pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios. No que se refere à resistência à oxacilina, pode-se constatar os seguintes mecanismos: hiperprodução de betalactamases, a presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP - *protein binding penicilin*) alterada denominada PBP2a e modificações na capacidade de ligação das PBPs. Essa proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos à oxacilina e a todos os antibióticos betalactâmicos (10).

A presença do gene *mecA* foi identificado em 8 das 10 amostras resistentes à oxacilina pelo CIM, perfazendo 80%. Estudo anterior, realizado por Faria (14) com amostras procedentes da comunidade, mostraram percentuais semelhantes. Estudos mais recentes demonstram a eficácia do teste de disco-difusão para cefoxitina como marcador substituto da detecção da resistência à oxacilina pelo gene *mecA* (2,34).

Empregando-se a técnica de PCR com o oligonucleotídeo RW3A, avaliou-se o grau de similaridade de 48 das 55 amostras isoladas do grupo de pacientes em diálise, sendo que de 7, não se obteve produto amplificado. Entre as 48 amostras tipificadas, 27 tiveram grau de similaridade superior a 80% e as demais (21) apresentaram grau de similaridade variando entre 20 e 80%.

Dezesseis amostras, pareadas duas a duas, tiveram 100% de similaridade. Esse resultado indica que as cepas estudadas apresentaram perfis genéticos idênticos ou

semelhantes, contudo estatisticamente não é possível afirmar que haja disseminação clonal na unidade de diálise nesta instituição. Os resultados da análise de similaridade genética com o oligonucleotídeo RW3A para as amostras de *S. aureus* isolados de pacientes em diálise são apresentados na Figura 1.

Os resultados do teste de similaridade genética mostraram que das 36 amostras de *S. aureus* isolados no grupo de pacientes transplantados renais, 2 apresentaram 95% de similaridade entre si, 8 tiveram similaridade de aproximadamente 90% e as demais (28) apresentaram similaridade inferior a 80%. Nesse grupo também não se confirmou a prevalência de um clone que pudesse estar disseminado na instituição. Os resultados da genotipagem com o oligonucleotídeo RW3A, para análise de similaridade genética entre as amostras de *S. aureus* isolados de pacientes transplantados, são apresentados na Figura 2.

Com a tipagem genética, pode-se constatar um perfil mais homogêneo entre as amostras isoladas de pacientes em diálise do que entre aquelas isoladas de pacientes transplantados renais. Poucos estudos foram realizados com o oligonucleotídeo RW3A para a tipificação de amostras de *S. aureus* isoladas de humanos. Estudo realizado por Santos e Darini (32) identificou baixa similaridade entre amostras de *S. aureus* relacionados a crianças e funcionários de uma instituição hospitalar, entretanto os autores destacaram o importante papel do estudo genotípico no delineamento da pesquisa, já que somente o antibiograma não forneceu parâmetros suficientes para distinção de amostras (32).

Entre as 16 amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes em diálise, pareadas duas a duas com 100% de similaridade entre si, observou-se que a maioria, 14, apresentou sensibilidade à oxacilina e 2 apresentaram perfis diferentes, sendo uma amostra sensível e a outra resistente. Entre as amostras isoladas de pacientes transplantados, apenas 2 tiveram similaridade de 95% entre si, sendo que ambas se mostraram sensíveis à oxacilina. O estabelecimento de correlação entre resistência antimicrobiana e disseminação de grupos

clonais de *S. aureus* é uma ferramenta importante na vigência de surtos, ou mesmo em condições de endemicidade. Jones et al (18) ao estudarem a colonização nasal para MRSA e sensibilidade a mupirocina, em pacientes admitidos em uma Unidade de Terapia Intensiva Cirúrgica, demonstraram, por meio da PCR com o *primer* RW3A, a existência de clones entre as amostras resistentes à mupirocina. Em nosso estudo não se observou qualquer correlação entre similaridade genética e sensibilidade, ou resistência, à oxacilina.

Considerando a alta frequência de carreadores de *S. aureus* e o perfil de multirresistência das amostras aos antimicrobianos, conforme demonstrado neste estudo, recomenda-se uma avaliação para a implementação de medidas de prevenção e controle, entre as quais: descontaminação nasal dos carreadores, medidas restritivas de uso de alguns dos antimicrobianos que apresentaram maior frequência de resistência as drogas usualmente empregadas na prática clínica, busca ativa de carreadores entre contactantes, rastreamento de fontes de disseminação e estudo pormenorizado de resistência antimicrobiana com metodologias seguras. Determinar com maior rigor metodológico a susceptibilidade à mupirocina e avaliar sua utilização na descontaminação nasal dos portadores de estirpes multirresistentes.

## REFERÊNCIAS

1. Alonso-Morquecho, A.; Flores-Preciado, H.; Martínez-García, M.C. (2000). Prevalence of infection in patients with central venous catheters. *Revista Enf. IMSS*. 8 (3), 139-143.
2. Anand, K.B.; Agrawal, P.; Kumar, S.; Kapila, K. (2009). Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin Screen Agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J. Med. Microbiol.* 27 (1), 27-29.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. (1996). *Resolução nº 196/96 - Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos*. FIOCRUZ, Brasília, DF.
4. Brasil. (2004a). *Deteção e identificação de bactérias de importância médica*. Brasília, DF.

5. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009a). *Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard*. Wayne, PA. CLSI. 10. ed. M02-A10.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010). *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement*. Wayne, PA. CLSI. Document M100-S20.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009b) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. Wayne, PA. CLSI. 8. ed. Document M07-A8.
8. Coia, J.; Duckworth, G.; Edwards, D.; Farrington, M.; Fry, C.; Humphreys, H. *et al.* (2006). Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J. Hosp. Infect.* 63, 1-44.
9. Datta, F.; Erb, T.; Heininger, U.; Gervaix, A.; Schaad, U.B. *et al.* (2008). A multicenter, cross-sectional study on the prevalence and risk factors for nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients admitted to children's hospitals in Switzerland. *Clin. Infect. Dis.* 47 (7), 923-926.
10. De Lencastre, H.; Oliveira, D.; Tomasz, A. (2007). Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* 10 (5), 428-435.
11. Deurenberg, R.H.; Stobberingh, E.E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution.* *J. Clin. Microbiol.* 8 (6), 747-763.
12. Dias Filho BP, Abreu Filho BA, Cardoso CL, Nakamura CV, Garcia LB, Guilhermetti M, *et al.* *Manual de aulas práticas: Enfermagem*. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.
13. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12 (1), 13-15.
14. Faria, S.T. (2009). *Staphylococcus aureus entre estudantes de enfermagem saudáveis*. Maringá, Paraná, Brasil, 57p. (M.Sc. Dissertation. Programa de Pós-graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá. UEM).
15. Ferreira, V.; Andrade, D.; Santos, C.B.; Moysés Neto, M.M. (2005). Infection in patient with temporary double-lumen catheter for hemodialysis. *Rev. Panam. Infectol.* 7 (2), 16-21.
16. Gold, I.M. (2005). The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 61 (4), 277-282.
17. Hong, F.; Goran, H. (2006). Use of cefoxitin-based selective broth for improved detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (2), 592-594.

18. Jones, J.C.; Rogers, T.J.; Brookmeyer, P.; Dunne Junior, W.M.; Storch, G.A.; Coopersmith, C.M. *et al.* (2007). Mupirocin resistance in patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Surgical Intensive Care Unit. *Clin. Infect. Dis.* 45, 541-547.
19. Kluytmans, J.; Van Belkum, A.; Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (3), 505-520.
20. Koneman, E.W. *et al.* (2008). *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 6. ed. Medsi, Rio de Janeiro.
21. Lencastre, H.; Wu, S.W.; Pinho, M.G.; Ludovice, A.M.; Filipe, S.; Gardete, S. *et al.* (1999). Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. *Microb. Drug. Resist.* 5 (3), 163-175.
22. Liao, R.S.; Storch, G.A.; Buller, R.S.; Orscheln, R.C.; Mardis, E.R.; Armstrong, J.R. *et al.* (2006). Blinded comparison of repetitive-sequence pcr and multilocus sequence typing for genotyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a children's hospital in St. Louis, Missouri. *J. Clin. Microbiol.* 44 (6), 2254-2257.
23. Mamizuka, E. (2005). *Projeto de resistência microbiana em serviços de saúde, Staphylococcus*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. <http://www.anvisa.gov.br>
24. Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (2005). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6. ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
25. Martins Júnior, P.O.; Porto, E.R.; Silva, R.N.; Pinhati, H.M.S. (2009). Prevalence of meticolin resistant *Staphylococcus aureus* isolated in blood cultures of hospitalized patients in Some Hospitals at Distrito Federal-Brazil. *Brasília Med.* 46 (2), 125-130.
26. Menegotto, F.R.; Picoli, S.V. (2007). *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 39 (2), 147-150.
27. Padoveze, M.C. (2004). *Estudo das infecções hospitalares em pacientes com HIV/AIDS hospitalizados e da colonização nasal por Staphylococcus aureus em pacientes com HIV/AID não hospitalizados*. Campinas, São Paulo, Brasil, 135p. (M.Sc. Tese. Faculdade de Ciências Médicas. Unicamp).
28. Palos, M.A.P. (2006). *Staphylococcus aureus e Staphylococcus aureus meticolina resistentes (MRSA) em profissionais de saúde e as interfaces com as infecções nosocomiais*. São Paulo, Brasil, 184p. (M.Sc.Tese. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. USP).

29. Reinoso, E.; Bettera, S.; Odierno, L.; Bogni, C.; *et al.* (2007). Rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 4, 115-121. Suplemento.
30. Ricardo, S.B. (2004). Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na comunidade. *Prat. hosp.* 34, 131-134.
31. Santos, A.L.; Santos, D.O.; Freitas, C.C.; Ferreira, B.L.A.; Afonso, I.F.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med.* 43 (6), 413-423.
32. Santos, B.M.O.; Darini, A.L.C. (2002). Colonization by *Staphylococcus aureus* in healthy carriers from a nursery in a university hospital. *Medicina*, 35 (2), 160-172.
33. Siripommongcolchain, T. *et al.* (2002). Evolution of different primers for detecting *mecA* genes by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* 33 (4), 758-763.
34. Swenson, J.M.; Lonsway, D.; McAllister, S.; Thompson, A.; Jevitt, L.; Patel, J.B. (2007). Detection of *mecA*-mediated resistance using cefoxitin disk diffusion (DD) in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing *borderline* oxacillin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58 (1), 33-39.
35. Tenover, F. C.; Arbeit R.; Archer, G.; Biddle, J.; Byrne, S.; Goering, R.; Hancock, G.; Hébert, G.A.; Hill, B.; Hollis, R. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32 (2), 407-415.
36. Toledo, M. R. F. (1989). *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 2. ed. Atheneu, Rio de Janeiro, Brasil, p. 105-109.
37. Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CY, Preston DA, Skatrud PL. (1992). Detection of methicillin-resistant *Staphylococci* by Using the Polymerase Chain Reaction. *J.Clin.Microbiol.* 30 (7), 1685-1691.
38. Van Belkum, A.; Kluytmans, J.; Van Leeuwen, W.; Bax, R.; Quint, W.; Peters, E.; *et al.* (1995). Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33 (6), 1537-1547.
39. Wertheim, H.; Vos, M.; Ott, A.; Van Belkum, A.; Voss, A.; Kluytmans, J.; Van Keulen, P.; Vandenbroucke-Grauls, C.; Meester, M.; Verbrugh, H. (2004). Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet.* 364 (9435), 703-705.

Tabela 1: Distribuição da resistência por disco difusão aos antimicrobianos dos *S. aureus* isolados de pacientes em diálise e transplantados renais da Santa Casa de Maringá, 2009.

Antimicrobianos	Transplantados Renais	Diálise	Total
Penicilina	(34/36) 94%	(50/55) 90%	(84/91) 92%
Cefoxitina	(06/36) 16%	(04/55) 3,6%	(10/91) 11%
Oxacilina	(06/36) 16%	(02/55) 7,2%	(8/91) 8,7%
Azitromicina	(24/36) 66%	(30/55) 54%	(54/91) 59%
Clindamicina	(24/36) 66%	(21/55) 38%	(45/91) 49%
Trimetropin/sulfametoxazol	(19/36) 52%	(16/55) 29%	(35/91) 38%
Tetraciclina	(26/36) 72%	(20/55) 36%	(46/91) 50%
Doxicilina	(09/36) 25%	(13/55) 23%	(22/91) 24%
Rifampicina	(07/36) 19%	(06/55) 10%	(13/91) 14%
Gentamicina	(09/36) 25%	(09/55) 16%	(18/91) 19%
Teicoplanina	(00/36) 0%	(00/55) 0%	(0/91) 0%
Ciprofloxacina	(24/36) 66%	(16/55) 29%	(40/91) 43%

Tabela 2: Distribuição da resistência aos antimicrobianos das dez amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina isolados de pacientes em diálise (D) e transplantados renais (T) da Santa Casa de Maringá, 2009.

Amostra	PEN	CEF	AZI	CLI	TRI	VAN	TET	DOX	RIF	GEN	TEI	CIP
6 T	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S
12 T	R	R	R	R	I	S	I	S	R	R	S	R
15 T	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
24 T	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
33 T	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	S	R
36 T	R	R	S	S	S	S	R	I	S	I	S	I
30 D	R	R	R	R	R	S	R	I	S	R	S	I
51 D	R	R	R	I	S	S	R	S	I	S	S	R
60 D	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
86 D	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

R: resistente; S: sensível; I: intermediário; PEN: penicilina; CEF: cefoxetina; AZI: azitromicina; CLI: clindamicina; TRI: trimetropin/sulfametoxazol; VAN: vancomicina; TET: tetraciclina; DOX: doxiciclina; RIF: rifampicina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; TEI: teicoplanina.

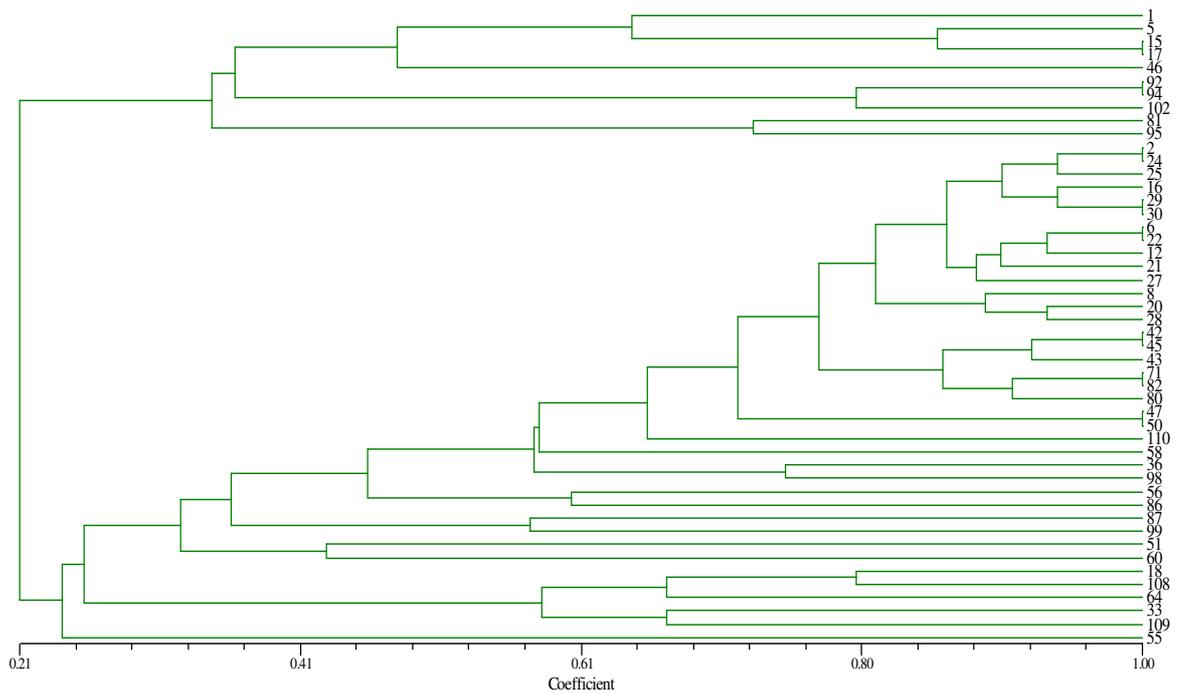


Figura 1: Resultados da análise de similaridade das amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes em diálise realizado pelo programa Numerical Taxonomy System (NTSYS).

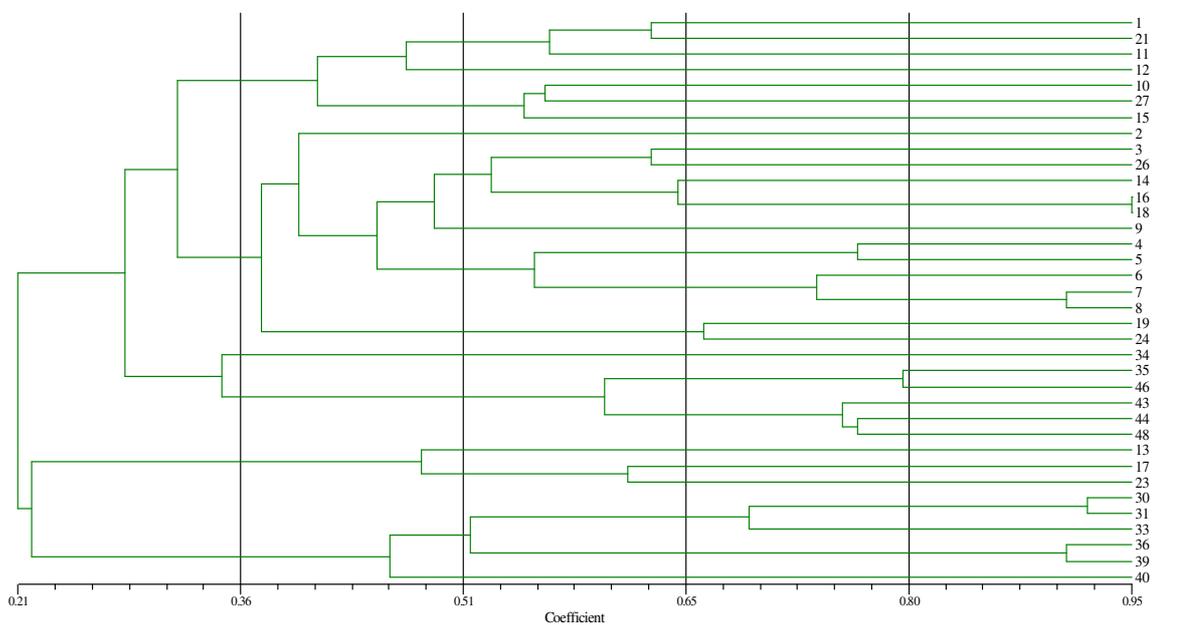


Figura 2: Resultados da análise de similaridade das amostras de *S. aureus* de pacientes transplantados realizado pelo programa Numerical Taxonomy System (NTSYS).

## 5.2 ARTIGO 2

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS HLA E O CARREAMENTO NASAL DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PACIENTES EM DIÁLISE E TRANSPLANTADOS RENAIIS EM UM HOSPITAL DO NORTE DO PARANÁ.**

Luciana Borges Giarola<sup>1</sup>,  
Rosiane Ribeiro dos Santos<sup>2</sup>,  
João Bedendo<sup>3</sup>,  
Waldir Veríssimo da Silva Júnior<sup>4</sup>,  
Sueli Donizete Borelli<sup>5</sup>

**RESUMO**

Indivíduos sadios podem albergar o *Staphylococcus aureus* na nasofaringe, superfície corporal e na vagina. A maioria das infecções invasivas por essa bactéria são endógenas, causadas por cepas disseminadas a partir da nasofaringe de carreadores. *Staphylococcus aureus* é um patógeno envolvido na etiologia de infecções hospitalares e comunitárias. Pacientes transplantados renais e em diálise são de risco para a colonização, ou infecção, pelo *S. aureus* multirresistente. A infecção está diretamente relacionada com a imunidade do indivíduo e o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) está envolvido em tais funções. Tem sido demonstrado que diferentes especificidades do CPH podem ser mais frequentes em indivíduos com determinadas doenças. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre moléculas HLA classe I (HLA-A e -B) e classe II (HLA-DRB1) e a condição de carreamento nasal por *Staphylococcus aureus* entre pacientes em diálise e transplantados renais de um Hospital do Norte do Paraná. A população desta pesquisa foi composta por 70 pacientes renais, em diálise, e 46 pacientes transplantados renais, totalizando 116 pacientes. Todos foram tipados para as moléculas HLA, classe I (A, B) e classe II (DRB1), e avaliados quanto ao carreamento nasal de *S. aureus*. Para os pacientes em diálise, com relação à molécula HLA-A, o alelo \*02 foi o mais frequente. O alelo HLA-A \*68 pode

---

<sup>1</sup> Enfermeira. Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá (UEM). [lu\\_giarola@hotmail.com](mailto:lu_giarola@hotmail.com)

<sup>2</sup> Enfermeira. Mestrando pelo Centro de Ciências da Saúde da UEM. [rosianeribeirosantos@hotmail.com](mailto:rosianeribeirosantos@hotmail.com)

<sup>3</sup> Enfermeiro. Doutor em Enfermagem. Docente do departamento de enfermagem da UEM. [jbedendo@uem.br](mailto:jbedendo@uem.br)

<sup>4</sup> Estatístico. Doutor em estatística. Docente do departamento de estatística da UEM. [wvsjunior2@uem.br](mailto:wvsjunior2@uem.br)

<sup>5</sup> Farmacêutica bioquímica. Doutora em Imunologia. Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá. \*Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Zona 07, Maringá, Paraná, Brasil. Telefone: 55 44 3011-4861. E mail: [sdborelli@uem.br](mailto:sdborelli@uem.br)

estar associado à proteção ao não-carreamento do *S. aureus*. Para os alelos do HLA-B e HLA-DRB1 não foi observado nenhum alelo envolvido na proteção ou suscetibilidade para o carreamento da bactéria em estudo. Para os pacientes transplantados renais, o HLA-A\*03 mostrou uma tendência à proteção, ao não carreamento da bactéria, assim como o alelo HLA-B\*15. O alelo HLA-DRB1 03\* parece estar relacionado à susceptibilidade ao carreamento do *S. aureus*. Esse estudo sugere a participação de alelos HLA classe I e classe II na resistência e suscetibilidade respectivamente ao carreamento nasal de *S. aureus*, entretanto novos estudos devem ser realizados para a confirmação desses resultados.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*. Antígenos HLA. Carreamento nasal.

## INTRODUÇÃO

*S. aureus* é um agente etiológico importante que se destaca por sua elevada frequência de ocorrência e patogenicidade que o capacita a produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos, quanto em hígidos. Esse microrganismo tem facilidade em se disseminar no ambiente hospitalar e versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos<sup>(1)</sup>.

Aproximadamente 20% da população adulta é carreadora de *Staphylococcus aureus* na nasofaringe, outros 30% carregam intermitentemente e 50% não são carreadores<sup>(2,3)</sup>. Carreadores nasais persistentes de *S. aureus* têm risco aumentado para o desenvolvimento de infecção<sup>(4,5)</sup>.

Os pacientes submetidos à diálise têm sido acometidos por infecções e, entre os patógenos mais prevalentes, destacam-se os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos*<sup>(6,7)</sup>.

A infecção está diretamente relacionada com a imunidade do indivíduo e o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), que consiste em um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossomo 6 humano, está envolvido em tais funções. Em particular, o CPH contém um grupo de genes que codificam diversas proteínas que são expressas na

superfície de vários tipos celulares. Nos seres humanos, tais moléculas são conhecidas como Antígenos Leucocitários Humanos, ou sistema HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigens*<sup>(8)</sup>.

As moléculas do sistema HLA são classificadas em moléculas classe I (HLA-A, -B e -C), classe II (HLA-DR, -DQ e -DP) e classe III. Tais moléculas são glicoproteínas altamente polimórficas e se diferenciam entre si quanto à localização em tecidos e funções. As moléculas classe I são localizadas na superfície de todas as células nucleadas do organismo e tem como função apresentar peptídeos às células T citotóxicas (CD8+). As moléculas classe II possuem distribuição mais restrita no organismo, sendo localizadas na superfície de células que estão diretamente relacionadas à resposta imune, tais como macrófagos, monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, linfócitos B e linfócitos T ativados, elas têm como função apresentar peptídeos às células T auxiliares (CD4+). A região classe III não codifica moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, como os fatores de necrose tumoral, as proteínas C4, C2 e o fator B do sistema complemento, a proteína do choque térmico e as enzimas 21-hidroxilase<sup>(9-12)</sup>.

Tem sido demonstrado que diferentes especificidades HLA podem ser mais frequentes em indivíduos com determinadas doenças e a caracterização dessas moléculas pode ter importantes implicações clínicas<sup>(13-15)</sup>.

A participação do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) na patogênese de doenças tem sido investigada em pacientes portadores de doenças dermatológicas<sup>(16-18)</sup>, tuberculose<sup>(19,20)</sup>, doenças psiquiátricas<sup>(21,22)</sup>, patologias auditivas<sup>(23,24)</sup>, oftalmológicas<sup>(25,26)</sup> e renais<sup>(27)</sup>, mas pouco se conhece sobre a correlação entre a tipagem HLA das diferentes etnias populacionais e a condição de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus*. O único trabalho, encontrado na literatura, relacionado ao tema data de 1983, em que foi investigada associação entre as moléculas HLA e o carreamento nasal de *S. aureus* entre trabalhadores saudáveis de um laboratório e pacientes atendidos em um ambulatório<sup>(28)</sup>.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar associação entre moléculas HLA classe I (HLA-A e -B) e classe II (HLA-DRB1) e a condição de carreamento nasal por *Staphylococcus aureus* entre pacientes em diálise e transplantados renais de um Hospital do Norte do Paraná.

## **METODOLOGIA**

A coleta do material biológico foi realizada no serviço de Diálise da Santa Casa de Maringá e as etapas posteriores, relacionadas à identificação do micro-organismo nas fossas nasais e o estudo do polimorfismo genético das moléculas HLA foram realizadas respectivamente no Laboratório de Microbiologia Básica e no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A população desta pesquisa foi composta por 70 pacientes renais, em diálise, e 46 pacientes transplantados, totalizando 116 pacientes. Todos os pacientes foram tipados com relação às moléculas HLA classe I (A, B) e classe II (DRB1), e avaliados quanto ao carreamento nasal. A coleta dos materiais biológicos, secreção nasal e sangue, ocorreu no período de junho a novembro de 2009.

### **Identificação do *Staphylococcus aureus***

As amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de pacientes submetidos a tratamento dialítico e transplantados renais foram obtidas pela fricção de um *swab* estéril em ambas as narinas. O material, após transferido para um tubo contendo Trypticase Soy Broth (TSB) acrescido de 6,5% de NaCl, com crescimento de 24 horas em estufa<sup>(29)</sup>, foi semeado na superfície de placas de Petri (90X15mm) contendo Agar Manitol Salgado (AMS) (Becton Dicksenson and Company, BD Diagnostic Systems, USA). Após 24-48 horas de incubação a 37°C, as colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à

Coloração de Gram e leitura em microscopia de imersão<sup>(30)</sup> e aquelas identificadas como cocos Gram positivo agrupados em forma de cachos de uva foram transferidas para TSB adicionado 6,5% de NaCl. Após seis horas de incubação foi realizado o Teste de Coagulase em tubo<sup>(31)</sup>. Posteriormente aos testes de identificação, as amostras foram estocadas em um meio TSB com glicerol (20%), e congeladas em freezer a  $-20^{\circ}$  C para estudos posteriores.

### **Tipagem HLA**

Extração de DNA humano: Amostras contendo 10 mL de sangue periférico foram coletadas por punção venosa com tubos a vácuo e anticoagulante EDTA e centrifugada a 2500rpm, durante 15 minutos, para obter a camada leucocitária. O DNA genômico foi extraído desta camada pelo reagente EZ-DNA, seguindo as instruções do fabricante (Biological Industries, Kibbutz Beit, Haemek).

Polimorfismo genético das moléculas HLA: para a tipificação HLA classe I (HLA-A e -B) e classe II (HLA-DRB1) foi utilizado o kit LABType® SSO One Lambda aliado à tecnologia Luminex. Esse método de PCR utiliza *primers* biotinizados. O material amplificado passa por um processo de desnaturação e posterior hibridização com sondas ligadas a microesferas (*beads*) que fazem parte do sistema multianalítico Luminex. Cada *bead* é marcada com uma determinada fluorescência e possui uma sonda de oligonucleotídeo correspondente a um alelo HLA, ou a um grupo de alelos HLA. Após a etapa de hibridização as sondas que hibridizaram com o DNA são marcadas com uma solução SAPE (estreptavidina conjugada com ficoeritrina). O citômetro de fluxo LABScan® 100 é capaz de reconhecer a fluorescência da *bead* e da SAPE ligada à sonda. Os dados gerados pelo aparelho foram analisados no software HLA Fusion para a determinação da tipagem HLA.

### **Tratamento estatístico**

Para a análise dos dados, os pacientes foram divididos em portadores e não-portadores da bactéria. Foi quantificado o número de vezes que um determinado alelo apareceu ( $n$ ) e a Frequência alélica ( $Fa$ ) nos dois grupos de pacientes. O valor de  $p$  foi calculado pelo Teste Exato de Fisher (P-valor), para os valores de  $p$  abaixo de 0,05, foi calculado o valor de  $p$  por meio da correção de Bonferroni (Pc-valor). Quando o valor de  $p$  era menor que 0,05, foi calculado o *odds ratio* (OR) e o Intervalo de Confiança (IC = 95%).

### **Aspectos éticos**

Este estudo obedeceu e respeitou todos os preceitos contidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP) da UEM, sob o parecer 212/2009<sup>(32)</sup>.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As moléculas HLA estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T e relacionadas à rejeição de enxertos. A determinação dessas moléculas é muito utilizada em estudos de associação com várias doenças, possibilitando a busca de marcadores específicos de suscetibilidade ou de resistência<sup>(33)</sup>. Um exemplo de marcador HLA específico para doença foi verificado em meados dos anos 70 para espondilite anquilosante e HLA-B27<sup>(34)</sup>.

No levantamento bibliográfico realizado para o desenvolvimento deste trabalho observamos poucos dados que tratam de estudos de associação com carreamento nasal de *S. aureus* e moléculas HLA. Por meio deste estudo foi possível observar que alguns alelos HLA poderiam estar envolvidos com o carreamento nasal de *S. aureus* em pacientes renais transplantados e pacientes sob tratamento.

Dos 70 pacientes em tratamento dialítico avaliados, 30 (42,8%) eram do sexo feminino e 40 (57,1%) do sexo masculino, a faixa etária variou de 22 a 85 anos. Trinta e três pacientes (47,1%) não carregavam *S. aureus* em suas fossas nasais, os 37 restantes (52,8%) eram carregadores.

Analisando a frequência dos alelos classe I, A e B, e classe II, DRB1 (Tabela 1) nos pacientes renais sob tratamento dialítico e o estado de ser portador ou não-portador nasal da bactéria *Staphylococcus aureus*, observa-se que o alelo A\*02 foi o mais frequente nos dois grupos, portadores (25,5%) e não-portadores (21,2%). O alelo A\*68 não foi observado no grupo de pacientes portadores da bactéria, enquanto que no grupo de pacientes não-portadores foi observado 6 vezes ( $Fa = 9\%$  versus;  $p = 0,0097$ ). Esse resultado pode sugerir uma tendência à proteção ou resistência ao carregamento, ou seja, indivíduos que possuem esse alelo podem estar protegidos para o carregamento nasal de *S. aureus*. Com relação aos alelos do locus B e HLA-DRB1, não foi observado nenhum alelo envolvido na proteção, ou suscetibilidade, para o carregamento da bactéria em estudo.

No grupo de transplantados renais, 46 pacientes foram avaliados, sendo 16 (34,7%) pacientes do sexo feminino e 30 (65,2%) do sexo masculino, a faixa etária variou entre 18 e 64 anos. Doze pacientes (26%) não carregavam *S. aureus* em suas fossas nasais, os 34 (74%) restantes eram carregadores.

De acordo com a tabela 2, analisando a frequência dos alelos classe I, A e B, e classe II, DRB1 nos pacientes renais transplantados e o estado de ser portador ou não-portador nasal da bactéria *Staphylococcus aureus*, observa-se que o alelo A\*03 esteve mais frequente no grupo de não-portadores (20,83%) do que no grupo de portadores (5,88%) ( $p=0,0486$ ), sugerindo uma tendência à proteção no carregamento da bactéria. O alelo B\*15 também parece sugerir uma tendência à proteção no carregamento da bactéria (portadores 5,88% e não-portadores 25%) com

valor de  $p < 0,05$  (0,0179). Quanto aos alelos classe II, o alelo DRB1\*03 parece estar relacionado à suscetibilidade ao carreamento do *S. aureus* ( $p = 0,0319$ ).

Encontramos um único trabalho, durante a revisão de literatura, relacionado ao tema HLA e carreamento nasal de *S. aureus*<sup>(28)</sup> sendo que a metodologia empregada foi a sorológica. Essa pesquisa foi realizada entre trabalhadores saudáveis de um laboratório e pacientes atendidos em um ambulatório da região de Dublin e Galway, na Irlanda. Encontrou-se associação positiva do antígeno HLA-DR3 com o carreamento de *S. aureus*, conferindo suscetibilidade ao indivíduo no carreamento da bactéria. Também foi observado que os antígenos classe I (HLA-Bw35) e classe II (HLA-DR2 e HLA-DRI) estavam envolvidos na resistência ao não carreamento da bactéria.

Embora o presente trabalho tenha utilizado metodologia molecular na determinação das moléculas HLA, pode-se considerar que esse trabalho seja pioneiro na confirmação da participação do alelo DRB1\*03 (equivalente sorológico -DR3) como um alelo possivelmente envolvido na suscetibilidade ao carreamento do *S. aureus*.

A importância de se identificar pacientes carreadores de *S. aureus*, em especial aqueles com perfil de multirresistência, está no fato desse patógeno estar relacionado a infecções endógenas. Nesse sentido, vale salientar que doenças infecciosas causam uma pressão genética seletiva, os genes envolvidos na resposta imune são os mais numerosos e polimórficos do genoma humano, implicando, assim, as vantagens evolutivas de uma resposta imunológica a uma ampla variedade de patógenos. Isso é evidenciado pela participação das moléculas HLA na apresentação de peptídeos estranhos às células do sistema imunológico<sup>(35)</sup>.

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho demonstrando um estudo de associação entre as moléculas HLA e portadores nasais de *S. aureus* em pacientes renais. Independente do grupo de pacientes

– transplantados ou em tratamento dialítico – observou-se uma maior frequência dos alelos HLA classe I (A\*03, A\*68 e B\*15) como sugestivo de proteção no carreamento do *S. aureus*. No tocante à frequência das moléculas HLA classe II, o alelo DRB1\*03 parece estar relacionado, como um marcador genético de suscetibilidade, ao carreamento da bactéria em estudo.

A elucidação do papel dos fatores genéticos do hospedeiro, além de poder contribuir para um melhor entendimento dos estados infecciosos, poderá, também, contribuir para futuras terapias de acordo com o progresso na área de farmacogenética.

### **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

SDB: tipagem HLA, elaboração do manuscrito e revisão crítica do conteúdo intelectual.

Responsável pela aprovação final da versão a ser publicada.

RRS: participou da coleta do material biológico, seu processamento e análise dos dados.

JB: elaboração do manuscrito e revisão crítica do conteúdo intelectual.

WVSJ: tratamento estatístico dos dados do manuscrito.

LBG: participou da coleta do material biológico, seu processamento, análise dos dados, elaboração do manuscrito e revisão crítica do conteúdo intelectual.

### **REFERÊNCIAS**

- 1- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG: **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. *PNAS* 2002, **99**(11): 7687-7692.
- 2- Boyce JM: **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a continuing infection control challenge**. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis* 1994, **13**:45-49.
- 3- Wertheim H, Melles D, Vos M, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh H, Nouwen J: **The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections**. *Lancet Infect Dis*. 2005, **5**(12):751-762.

- 4- Gonzalez-Zorn B, Senna JPM, Fiette L, Shorte S, Testard A, Chignard M, Courvalin P, Grillot-Courvalin C: **Bacterial and host factors implicated in nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice.** *Infect Immun.* 2005, **73**(3):1847-1851.
- 5- Van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM: **Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*.** *J Bacteriol.* 2005, **187** (13):4584-4591.
- 6- Alonso-Morquecho A, Flores-Preciado H, Martínez-García MC: **Prevalence of infection in patients with central venous catheters.** *Revista Enf. IMSS* 2000, **8** (3):139-143.
- 7- Ferreira V, Andrade D, Santos CB, Neto MM: **Infection in patient with temporary double-lumen catheter for hemodialysis.** *Rev Panam Infectol* 2005, **7** (2):16-21.
- 8- Peakman M, Vergani D: *Imunologia básica e clínica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
- 9- Pamer E, Cresswell P: **Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing.** *Annual Review of Immunology* 1998, **16**:323-358.
- 10- Navarrete CV: **The HLA system in blood transfusion.** *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000, **13**:511-132.
- 11- Turner D: **The human leucocyte antigen (HLA) system.** *Vox Sang* 2004, **87**(Suppl 1):87-90.
- 12- Alves C, Vieira N, Meyer I, Alves CO, Toralles MBP, Oliveira MFSP: **Human histocompatibility antigens and Dermatology: from research to clinical practice.** *An. Bras. Dermatol* 2006, **81**:65-73.
- 13- Neustadt DH: **Ankylosing spondilitis.** *Postgrad Med* 1977, **61** (1):124-135.
- 14- Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K: **A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations.** *World J Gastroenterol* 2007, **13** (12):1770-1787.
- 15- Jacobson EM, Huber A, Tomer Y: **The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology.** *J Autoimmun* 2008, **30** (1-2):58-62.
- 16- Arnet FC: **HLA and genetic predisposition to lupus erythematosus and other dermatologic disorders.** *J Am Acad Dermatol* 1985, **13** (3):472-481.
- 17- Biral AC, et al : **Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients.** *Eur J Dermatol* 2006, **16** (5):523-529.
- 18- Belazariam L: **New insights and therapies for teenage psoriasis.** *Curr Opin Pediatr* 2008, **20** (4):419-424.

- 19- John GT, Murugesan K, Jeyaseelan L, Pulimood RB, Jacob CK, Shastry JC: **HLA phenotypes in Asians developing tuberculosis on dialysis or after renal transplantation.** *Natl Med J India* 1995, **8** (3):144-146.
- 20- Harfouch-Hammoud EI, Daher NA: **Susceptibility to and severity of tuberculosis is genetically controlled by human leukocyte antigens.** *Saudi Med J* 2008, **29** (11):1625-1629.
- 21- Gaughran F: **Immunity and schizophrenia: autoimmunity, cytokines, and immune response.** *Int Rev Neurobiol* 2002, **52**:275-302.
- 22- Nunes SOV, Borelli SD, Matsuo T, Watanabe MAE, Itano EN: **The association of the HLA in patients with schizophrenia, schizoaffective disorders, and in their biological relatives.** *Schizophr Res* 2005, **76** (2-3):195-198.
- 23- Yeo SW: **Distribution of HLA-A,-B and –DRB1 alleles in patients with sudden sensorineural hearing loss.** *Acta Otolaryngol* 2000, **120** (6):710-715.
- 24- Amor-Dorado JC, Paco L, Martin J, Lopez-Nevot MA, Gonzalez-Gay MA: **Human leukocyte antigen –DQB1 and –DRB1 association in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss from a defined population of Northwest Spain.** *Acta Otolaryngol* 2005, **125** (12):1277-1282.
- 25- Quiroz-Mercado H, Suárez-Licon A, Fromow-Guerra J, López-Carasa G, Cárdenas-Hernández R, Ruiz-Morales JA, et al: **Human lymphocyte antigen DR7 protects against proliferative retinopathy with type II diabetes mellitus.** *Arch Med Res* 2002, **33** (2):123-127.
- 26- Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Inatomi T, Yabe T, Matsushita M, et al: **HLA class I and II gene polymorphisms in Stevens-Johnson syndrome with ocular complications in Japanese.** *Mol Vis* 2008, **14**: 550-555.
- 27- Crispim JC, Mendes-Júnior CT, Wastowski IJ, Palomino GM, Saber LT, Rassi DM, et al: **HLA polymorphisms as incidence factor in the progression to end-stage renal disease in Brazilian patients awaiting kidney transplant.** *Transplant Proc* 2008, **40** (5):1333-1336.
- 28- Kinsman OS, Mckenna R, Noble WC: **Association between histocompatibility antigens (HLA) and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*.** *J Med Microbiol* 1983, **16**: 215-220.
- 29- Dias Filho BP: *Manual de aulas práticas: Enfermagem.* Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2001.
- 30- Toledo MRF. *Staphylococcus.* In: Trabulsi LR: *Microbiologia.* 2a edição. Rio de Janeiro: Atheneu; 1989:105-109.
- 31- Koneman EW: *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.* 6a edição. Rio de Janeiro: Medsi; 2008.

- 32- Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. *Resolução nº 196/96 - Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos*. Brasília, DF: MS: FIOCRUZ; 1996.
- 33- Caillat-Zucman S: **Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases**. *Tissue Antigens* 2008, **73** (1):1-8.
- 34- Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM: **High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis**. *N Engl J Med* 1973, **288**:704-706.
- 35- Burgner D, Jamieson S, Blackwell J: **Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better?** *Lancet Infect Dis* 2006, **6** (10):653-663.

Tabela 1: Frequência alélica (HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1) no grupo de pacientes renais, em tratamento dialítico, portadores e não-portadores nasais de *Staphylococcus aureus*.

Alelo	Portadores		Não-portadores		P-valor	Pc-valor	OR	IC (95%)	Alelo	Portadores		Não-portadores		P-valor	Pc-valor	OR	IC (95%)
	n	Fa%	n	Fa%						n	Fa%						
<b>HLA-A</b>									<b>HLA-B</b>								
<b>01</b>	9	12,1	6	9,0	ns	-			<b>05</b>	0	-	1	1,5	ns	-		
<b>02</b>	19	25,6	14	21,2	ns	-			<b>07</b>	4	5,4	6	9,0	ns	-		
<b>03</b>	6	8,1	7	10,6	ns	-			<b>08</b>	4	5,4	5	7,5	ns	-		
<b>11</b>	6	8,1	4	6,0	ns	-			<b>13</b>	1	1,3	0	-	ns	-		
<b>23</b>	2	2,7	2	3,0	ns	-			<b>14</b>	0	-	2	3,0	ns	-		
<b>24</b>	9	12,1	10	15,1	ns	-			<b>15</b>	1	1,3	3	4,5	ns	-		
<b>25</b>	3	4,0	0	-	ns	-			<b>16</b>	0	-	1	1,5	ns	-		
<b>26</b>	2	2,7	5	7,5	ns	-			<b>18</b>	7	9,4	6	9,0	ns	-		
<b>29</b>	3	4,0	1	1,5	ns	-			<b>22</b>	1	1,3	0	-	ns	-		
<b>30</b>	5	6,7	5	7,5	ns	-			<b>27</b>	2	2,7	0	-	ns	-		
<b>31</b>	3	4,0	1	1,5	ns	-			<b>35</b>	6	8,1	4	6,0	ns	-		
<b>32</b>	2	2,7	2	3,0	ns	-			<b>38</b>	3	4,0	3	4,5	ns	-		
<b>33</b>	2	2,7	2	3,0	ns	-			<b>39</b>	3	4,0	4	6,0	ns	-		
<b>34</b>	2	2,7	1	1,5	ns	-			<b>40</b>	1	1,3	2	3,0	ns	-		
<b>68</b>	0	-	6	9,0	0,0097	0,1552	-	-	<b>41</b>	0	-	1	1,5	ns	-		
<b>74</b>	1	1,3	0	-	ns	-			<b>42</b>	2	2,7	1	1,5	ns	-		
<b>HLA-DRB1</b>									<b>44</b>	6	8,1	5	7,5	ns	-		
<b>01</b>	3	4,0	5	7,5	ns	-			<b>45</b>	2	2,7	0	-	ns	-		
<b>03</b>	1	1,3	2	3,0	ns	-			<b>49</b>	2	2,7	2	3,0	ns	-		
<b>04</b>	10	13,5	13	19,7	ns	-			<b>50</b>	1	1,3	3	4,5	ns	-		
<b>07</b>	8	10,8	6	9,0	ns	-			<b>51</b>	7	9,4	8	12,1	ns	-		
<b>08</b>	5	6,7	2	3,0	ns	-			<b>52</b>	2	2,7	2	3,0	ns	-		
<b>09</b>	1	1,3	0	-	ns	-			<b>53</b>	1	1,3	2	3,0	ns	-		
<b>10</b>	3	4,0	3	4,5	ns	-			<b>55</b>	4	5,4	0	-	ns	-		
<b>11</b>	17	22,9	11	16,6	ns	-			<b>57</b>	3	4,0	0	-	ns	-		
<b>13</b>	6	8,1	7	10,6	ns	-			<b>58</b>	1	1,3	2	3,0	ns	-		
<b>14</b>	5	6,7	1	1,5	ns	-			<b>60</b>	2	2,7	1	1,5	ns	-		
<b>15</b>	3	4,0	7	10,6	ns	-			<b>61</b>	2	2,7	0	-	ns	-		
<b>16</b>	5	6,7	6	9,0	ns	-			<b>62</b>	4	5,4	0	-	ns	-		
<b>17</b>	3	4,0	3	4,5	ns	-			<b>65</b>	1	1,3	2	3,0	ns	-		
<b>18</b>	1	1,3	0	-	ns	-			<b>81</b>	1	1,3	0	-	ns	-		
<b>51</b>	1	1,3	0	-	ns	-											
<b>52</b>	2	2,7	0	-	ns	-											

n = número de vezes que o alelo apareceu; Fa = Frequência alélica; P-valor = calculado pelo Teste Exato de Fisher; Pc-valor = valor de p corrigido para correção de Bonferroni; OR = odds ratio; IC (95%) = Intervalo com 95% de confiança; ns = não significante (p>0,05).

Tabela 2: Frequência alélica (HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1) no grupo de pacientes renais, transplantados, portadores e não-portadores nasais de *Staphylococcus aureus*.

Alelo	Portadores		Não-portadores		P-valor	Pc-valor	OR	IC (95%)	Alelo	Portadores		Não-portadores		P-valor	Pc-valor	OR	IC (95%)
	n	Fa%	n	Fa%						n	Fa%						
<b>HLA-A</b>									<b>HLA-B</b>								
<b>01</b>	9	13,24	2	8,33	ns	-			<b>07</b>	5	7,35	1	4,17	ns			
<b>02</b>	21	30,88	6	25,0	ns	-			<b>08</b>	6	8,82	0	-	ns			
<b>03</b>	4		5		<b>0,0486</b>	0,7776	0,23	0,0579 ;	<b>12</b>	0	-	1		ns			
		5,88		20,83			75	0,9738					4,17				
<b>11</b>	2	2,94	0	-	ns	-			<b>13</b>	2	2,94	1	4,17	ns			
<b>23</b>	1	1,47	1	4,17	ns	-			<b>14</b>	3	4,41	0	-	ns			
<b>24</b>	9		2		ns	-			<b>15</b>	4		6		<b>0,0179</b>	0,4833	0,1875	0,0477-
		13,24		8,33							5,88		25,0				0,7371
<b>26</b>	2	2,94	1	4,17	ns	-			<b>18</b>	2	2,94	1	4,17	ns			
<b>28</b>	0	-	1	4,17	ns	-			<b>27</b>	0	-	1	4,17	ns			
<b>29</b>	4	5,88	0	-	ns	-			<b>35</b>	8	11,76	2	8,33	ns			
<b>30</b>	6	8,82	1	4,17	ns	-			<b>37</b>	2	2,94	1	4,17	ns			
<b>31</b>	2	2,94	1	4,17	ns	-			<b>38</b>	1	1,47	0	-	ns			
<b>32</b>	1	1,47	1	4,17	ns	-			<b>39</b>	2	2,94	0	-	ns			
<b>33</b>	3	4,41	0	-	ns	-			<b>40</b>	1	1,47	3	12,50	ns			
<b>36</b>	1	1,47	0	-	ns	-			<b>41</b>	1	1,47	1	4,17	ns			
<b>66</b>	1	1,47	0	-	ns	-			<b>42</b>	1	1,47	0	-	ns			
<b>68</b>	2	2,94	3	12,50	ns	-			<b>44</b>	5	7,35	3	12,50	ns			
<b>HLA-DRB1</b>									<b>45</b>	2	2,94	0	-	ns			
<b>01</b>	3	4,41	0	-	ns	-			<b>47</b>	0	-	1	4,17	ns			
<b>03</b>	12	17,65	0	-	<b>0,0319</b>	0,4785			<b>49</b>	4	5,88	0	-	ns			
<b>04</b>	9	13,24	3	12,50	ns	-			<b>51</b>	6	8,82	1	4,17	ns			
<b>07</b>	3	4,41	4	16,67	ns	-			<b>52</b>	3	4,41	0	-	ns			
<b>08</b>	2	2,94	2	8,33	ns	-			<b>53</b>	1	1,47	0	-	ns			
<b>09</b>	3	4,41	1	4,17	ns	-			<b>55</b>	1	1,47	0	-	ns			
<b>10</b>	0	-	1	4,17	ns	-			<b>57</b>	4	5,88	0	-	ns			
<b>11</b>	13	19,12	6	25,0	ns	-			<b>58</b>	2	2,94	1	4,17	ns			
<b>12</b>	0	-	2	8,33	ns	-			<b>62</b>	1	1,47	0	-	ns			
<b>13</b>	6	8,82	1	4,17	ns	-			<b>70</b>	1	1,47	0	-	ns			
<b>14</b>	5	7,35	0	-	ns	-											
<b>15</b>	7	10,29	2	8,33	ns	-											
<b>16</b>	2	2,94	2	8,33	ns	-											
<b>17</b>	2	2,94	0	-	ns	-											
<b>18</b>	1	1,47	0	-	ns	-											

n = número de vezes que o alelo apareceu; Fa = Frequência alélica; P-valor = calculado pelo Teste Exato de Fisher; Pc-valor = valor de p corrigido para correção de Bonferroni; OR = odds ratio; IC (95%) = Intervalo com 95% de confiança; ns = não significante ( $p > 0,05$ ).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo trouxe informações a respeito do carreamento nasal de *S. aureus* em pacientes transplantados renais e em tratamento dialítico. O carreamento nasal dessa bactéria é uma ameaça, devido aos casos de infecções endógenas a que esses pacientes estão sujeitos.

O presente estudo teve por objetivo identificar a prevalência e o perfil fenotípico e genotípico de amostras de *S. aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de pacientes, em tratamento dialítico e transplantados renais, e verificar associação entre as moléculas do HLA e a condição de carreamento nasal.

Os resultados demonstraram uma alta ocorrência de *S. aureus* entre os pacientes pesquisados, com uma elevada frequência de amostras multirresistentes incluindo a oxacilina. Verificou-se o carreamento de elemento genético *mecA* responsável por perpetuação dessa resistência. A taxa de resistência à oxacilina obtida pelo método de ágar diluição foi diferente daquela pelo método de disco difusão, salientando a necessidade de se adotar outras metodologias para comprovação de resultados. Os resultados da tipagem genética mostraram um perfil mais homogêneo entre as amostras isoladas de pacientes em diálise, indicando a existência de cepas com perfis genéticos idênticos, ou semelhantes, dentro do ambiente hospitalar, contudo não é possível afirmar que haja disseminação clonal na unidade de diálise nesta instituição. O estudo do polimorfismo genético das moléculas HLA sugere a participação de alelos HLA classe I e classe II na resistência e suscetibilidade, respectivamente ao carreamento nasal de *S. aureus*, entretanto novos estudos devem ser realizados para a confirmação desses resultados.

A identificação do carreamento nasal de *S. aureus* em pacientes renais proporciona informações para a construção de estratégias de prevenção de infecções e controle no que se refere à disseminação de amostras resistentes à oxacilina, ou com perfil de multirresistência. Como medidas de prevenção podem ser citadas: descontaminação nasal dos carreadores; medidas restritivas de uso de alguns dos antimicrobianos que apresentaram maior frequência de resistência; busca ativa de carreadores entre contactantes; estudo pormenorizado de resistência antimicrobiana com metodologias seguras, incluindo a Mupironina e o rastreamento de fontes de disseminação.

A tipagem genética possibilitou a diferenciação de isolados com fenótipos idênticos, estabelecer rotas de disseminação, relacionar isolados de diferentes fontes e identificar geneticamente cepas diferentes, ou iguais, dispersas no ambiente hospitalar. Vale ressaltar que a tipagem HLA proporcionou uma avaliação do papel de fatores genéticos do hospedeiro no carreamento nasal.

**REFERÊNCIAS**

AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A. et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, D. C., v. 8, no. 5, p. 959-964, 2001.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALONSO, A. M.; FLORES, H. P.; MARTÍNEZ, M. C. G. Prevalência de infecção em pacientes com catéter venoso central. **Rev. Enf. IMSS.**, v. 8, no. 3, p. 139-143, 2000.

ALVES, C.; VIEIRA, N.; MEYER, I. et al. Antígenos de histocompatibilidade humanos e dermatologia: da pesquisa para a prática clínica. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, p. 65-73, 2006.

AMOR-DORADO, J. C.; PACO, L.; MARTIN et al. Human leukocyte antigen –DQB1 and –DRB1 association in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss from a defined population of Northwest Spain. **Acta Otolaryngol.**, v. 125, no. 12, p. 1277-1282, 2005.

ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 49 f.

ARNET, F. C. HLA and genetic predisposition to lupus erythematosus and other dermatologic disorders. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 13, no. 3, p. 472-481, 1985.

AUBRY-DAMON, H.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996 to 1998. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 5, no. 3, p. 315-320, 1999.

BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 19, p. 1S-8S, 1990. Supplement.

BANIA, J.; DABROWSKA, A.; KORZEKWA, K. et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 42, p. 315-320, 2006.

BELAZARIAM, L. New insights and therapies for teenage psoriasis. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 20, no. 4, p. 419-424, 2008.

BERNARDO, W. L. C. et al. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 47, p. 19-24, 2005.

BICALHO, M. G.; RUIZ, T. M.; COSTA, S. M. C. et al. Haplótipos HLA mais frequentes em doadores voluntários de medula óssea de Curitiba, Paraná. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Santos, v. 24, no. 4, p. 306-309, 2002.

BIRAL, A. C. ; MAGALHAES, R. F.; WASTOWSKI, I. J. et al. Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients. **Eur. J. Dermatol.**, [S. l.] v. 16, no. 5, p. 523-529, 2006.

BOYCE, J. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a continuing infection control challenge. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v. 13, p. 45-49, 1994.

BOYCE, J. M. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. **J. Hosp. Infect.**, New Haven, v. 48 Suppl, p. 9-14, 2001.

BRAGA, A. C. P. V. et al. **Módulo 4 – Gran-positivos: *Staphylococcus spp.*** 2008.

Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/itr\\_sta.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/itr_sta.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 196/96:** Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DF: Fiocruz, 1996.

\_\_\_\_\_. **Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília, DF, 2004a.

BRODSKY, F. M. Antigen presentation & the major histocompatibility complex. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. (Ed.). **Medical Immunol.**, 9th ed. Stanford: Appleton & Lange, 1997. p. 83- 94.

CAILLAT-ZUCMAN, S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 73, p. 1-8, 2008.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. *Staphylococci*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 29, p. 23-32, 2007.

CAVALCANTE, S. M. M.; FRANÇA, E. R.; VILELA, M. A. et al. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de Terapia Intensiva de Hospital Universitário, Pernambuco, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 436-446, 2006.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, no. 2, p. 178-182, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**: nineteenth informational supplement. Wayne: [s.n.], 2010. CLSI. Document M100-S20.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. CLSI. 10. ed. Wayne, PA, 2009a. M02-A10.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. CLSI. 8th ed. Wayne: [s.n.], 2009b. Document M07-A8.

COOKSON, B. D.; ROBINSON, D. A.; MONK, A. B. et al. Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: the HARMONY Collection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 45, no. 6, p. 1830-1837, 2007.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G. Epidemiologia hospitalar. In: COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. (Ed.). **Infecção hospitalar e outras complicações não-infecciosas da doença**. 3. ed. São Paulo: Medsi, 2003. cap. 6, p. 93-155.

CRISPIM, J. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; WASTOWSKI, I. J. Et al. HLA polymorphisms as incidence factor in the progression to end-stage renal disease in Brazilian patients awaiting kidney transplant. **Transplant Proc.**, [S. l.], v. 40, no. 5, p. 1333-1336, 2008.

- CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, J. et al. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, D.C., v. 50, no. 2, p. 428-438, 2006.
- DEGO, O. K.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion – a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 24, p. 181-198, 2002.
- DEL VECCHIO, V. G.; PETROZIELLO, J. M.; GRESS, M. J. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **J. Clin. Microbiol**, Washington, D. C., v. 33, no. 8, p. 2141-2144, 1995.
- DERBISE, A.; DYKE, K. G. H.; EL SOLH, N. Isolation and characterization of IS1181, an insertion sequence from *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, New York, v. 31, p. 251–264, 1994.
- DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infection, Genetics and Evolution. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 8, no. 6, p.747-763, 2008.
- DIAS FILHO, B. P.; ABREU FILHO, B. A.; CARDOSO, C. L. et al. **Manual de aulas práticas:** Enfermagem. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas, 2001.
- DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 7-18, 2000.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S. l.], v. 12, no.1, p.13-15, 1990.
- DYKE, K. G. H.; AUBERT, S.; EL SOLH, N. Multiple copies of IS256 in *staphylococci*. **Plasmid.**, New York, v. 28, p. 235-246, 1992.
- EBI. **European Bioinformatics Institute**. 2009. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>>. Acesso em: 23 ago. 2009.

EL-FAR, F.; RICHTMANN, R. Prevenir ainda é a melhor opção: a luta contra os Gram-positivos multirresistentes. *Infectologia. Prática Hospitalar*, São Paulo, ano 3, n. 13, p. 7-9, 2001.

ELLIOT, M. J.; KELLUM, M. T.; TENOVER, F. C. et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among paramedics in the Sedgwick Medical Service in Wichita, Kansas. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Thorofare, v. 23, p. 60-63, 2002.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, A.; RANDLE, G. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*, Washington, D. C., v. 99, no. 11, p. 7687-7692, 2002.

ERLICH, H.A.; OPELZ, G.; HANSEN, J. HLA DNA Typing and transplantation. *Immunity.*, Cambridge, v. 14, p. 347-356, 2001.

ETM. **Etest® Technical Manual**. 2008. Disponível em: <[www.abbiotest.com/pdf/etm\\_index.htm](http://www.abbiotest.com/pdf/etm_index.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2009.

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997.

FELIX JUNIOR, L. F. **Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina: revisão da literatura**. 2007. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência)-Hospital Regional Asa Sul. Brasília, DF, 2007.

FERNANDES, A. T. As bases do hospital contemporâneo: a enfermagem, os caçadores de micróbios e o controle de infecção. In: FERNANDES, A. T. et al. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 91-128.

FERREIRA, V.; ANDRADE, D.; SANTOS, C. B. et al. Infecção em pacientes com cateter temporário duplo lúmen para a hemodiálise. *Rev Panam Infectol.*, v. 7, n. 2, p. 16-21, 2005.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, M. L. S. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

FRAZIER, W. C.; WESHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

GAUGHRAN, F. Immunity and schizophrenia: autoimmunity, cytokines, and immune response. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 52, p. 275-302, 2002.

GONZALEZ-ZORN, B.; SENNA, J. P.; FIETTE, L. et al. Bacterial and host factors implicated in nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. **Infect. Immun.**, New York, v. 73, p. 1847-1851, 2005.

GOULD, I. M. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Hospital. Infection**, London, v. 61, no. 4, p. 277-282, 2005.

GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ISTURIZ, R. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin América. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 34, no. 4, p. 304-308, 2009.

HALL, L. M. C. Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment length polymorphisms that are used to type bacteria. **Microbiology**, London, v. 140, p. 197-204, 1994.

HARFOUCH-HAMMOUD, E. I.; DAHER, N. A. Susceptibility to and severity of tuberculosis is genetically controlled by human leukocyte antigens. **Saudi. Med. J.**, Riyadh, v. 29, no. 11, p. 1625-1629, 2008.

HIGUCHI, W.; TAKANO, T.; TENG, L. et al. Structure and specific detection of *Staphylococcal cassette chromosome mec* type VII. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 377, no. 3, p. 752-756, 2008.

HONG, F. A. N.; GORAN, H. Use of cefoxitin-based selective broth for improved detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 44, no. 2, p. 592-594, 2006.

HOSEIN, I. K.; HILL, D. W.; JENKINS, L. E. et al. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 92, suppl. S1, p. 90S-97S, 2002.

ISSACK, M. I.; POWER, E. G. M.; FRENCH, G. L. Investigation of an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **J. Hospital Infection.**, London, v. 33, no. 3, p. 191-200, 1996.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, D. C., v. 45, no. 5, p. 1323-1336, 2001.

JACOBSON, E. M.; HUBER, A.; TOMER, Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. **J. Autoimmun.**, London, v. 30, p. 58-62, 2008.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JOHN, G. T.; MURUGESAN, K.; JEYASEELAN, L. et al. HLA phenotypes in Asians developing tuberculosis on dialysis or after renal transplantation. **Natl. Med. J. India**, [S. l.], v. 8, no. 3, p. 144-146, 1995.

KINSMAN, O. S.; McKENNA, R.; NOBLE, W.C. Association between histocompatibility antigens (HLA) and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 16, p. 215-220, 1983.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1991.

KONEMAN, E. W. et al. Cocos Gram-Positivos: Parte I: estafilococos e microrganismos relacionados. In: KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 551- 588.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2008.

KRENSKY, A. M.; WEISS, A.; CRABTREE, G. et al. T-lymphocyte-antigen interactions in transplanted rejection. **New Engl. J. Med.**, Boston, v. 322, n. 8, p. 510-517, 1990.

KUEHERT, M. J.; KRUSZON-MORAN, D.; HILL, H. A. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 193, p. 172-179, 2006.

LECHLER R. The roles of class I and II molecules of the major histocompatibility complex in T-cell immunity. In: LECHLER, R. (Ed.). **HLA & disease**. London: Academic Press, 1994a. p. 49-72.

LECHLER, R. Mechanisms of HLA and disease associations. In: LECHLER, R. (Ed.). **HLA & disease**. London: Academic Press, 1994b. p. 83-91.

LENCASTRE, H.; WU, S.W.; PINHO, M. G. et al. Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 5, no. 3, p. 163-175, 1999.

LIAO R. S.; STORCH, G. A.; BULLER, R. S. et al. Blinded Comparison of Repetitive-Sequence PCR and Multilocus Sequence Typing for Genotyping Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Children's Hospital in St. Louis, Missouri. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 44, no. 6, p. 2254-2257, 2006.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the exemple of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 111, p. 1265-1273, May 2003.

LU, P.; CHIN, L. C.; PENG, C. F. et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 43, no. 1, p. 132-139, 2005.

LYON, B. R.; GILLESPIE, M. T.; SKURRAY R. A. Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 133, p. 3031-3038, 1987.

MARTINS, L. T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. cap.18, p. 149-156.

MAXWELL. J. G.; FORD, C. R.; PETERSON, D. E. et al. Long-term study of nasal *staphylococci* among hospital personnel. **Amer. J. Surg.**, New York, v. 118, no. 6, p. 849-854, 1969.

MENDES, C.; MARIN, M. E.; QUÍÑONES, F. et al. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the Project surveillance study (1999-2000). **Braz. J. Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, no. 1, p. 44-61, 2003.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. V. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 147-150, 2007.

MERCIER, E.; JUMAS-BILAK, E.; ALLARDET-SERVENT, A. et al. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 34, no. 5, p. 1299-1302, 1996.

MEREILLON, P. Bacterial resistance to antibiotics. **Schweiz Med.**, Lausanne, v.125, no. 23, p. 1151-1161, 1995.

MIMICA, M. J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MORVAN, A.; AUBERT S.; GODARD, C. et al. Contribution of a typing method based on IS256 probing of *Sma*I-digested cellular DNA to discrimination of European phage type 77 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 35, p. 1415-1423, 1997.

MOURA, A. C. **Variabilidade genética de amostras de *E. coli* Aviária avaliada por ERIC-PCR e REP-PCR.** 2000. 51 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

MOURA, J. P.; GIR, E. Conhecimento dos profissionais de enfermagem referente à resistência bacteriana a múltiplas drogas. **Acta Paul. Enferm.**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 351-356, 2007.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology.** 7th ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1999. p. 325-337.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Taxonomy Browser.** 2006. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/)>. Acesso em: 20 dez. 2009.

NAVARRETE, C. V. The HLA system in blood transfusion. **Baillieres Best Pract. Res. Clin Haematol.**, London, v. 13, p. 511-532, 2000.

NEUSTADT, D. H. Ankylosing spondylitis. **Postgrad Med.**, [S. l.], v. 61, p. 124-135, 1977.

NEVES, M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; ALVES, E. C. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus aureus* SPP. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 207-213, 2007.

NUNES, S.O.V.; BORELL, S.D.; MATSUO, T. et al. The association of the HLA in patients with schizophrenia, schizoaffective disorders, and in their biological relatives. **Schizophr Res.**, Amsterdam, v. 76, no. 2-3, p. 195-198, 2005.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, D. C., v. 46, no. 7, p. 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; LECASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, London, v. 2, no. 5, p. 180-189, 2002.

ONONUGA, A.; OYI, A. R.; ONAOLAPO, J. A. Prevalence and susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates among healthy women in Zaria, Nigéria. **Afr. J. Biotechnol.**, Nairobi, v. 4, no. 11, p. 1321-1324, 2005.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, D.C., v. 17, no. 1, p. 218-234, 2004.

PALMQVIST, N.; FOSTER, T.; TARKOWSKI, A. et al. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. **Microb. Pathol.**, London, v. 33, p. 239-249, 2002.

PAMER, E.; CRESSWELL, P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. **Ann. Rev. Immunol.**, Washington, DC, v. 16, p. 323-358, 1998.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

PERL, T. M. et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 346, p. 1871-1877, 2002.

PFALLER, M. A. Molecular epidemiologic typing of nosocomial pathogens. **ASCP Spring**, Sept. Teleconference Série, 1993.

QUIROZ-MERCADO, H.; SUÁREZ-LICONA, A. et al. Human lymphocyte antigen DR7 protects against proliferative retinopathy with type II diabetes mellitus. **Arch. Med. Res.**, México, v. 33, no. 2, p. 123-127, 2002.

REINOSO, E.; BETTERA, S.; ODIERNO, L. et al. Rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.4, p. 115-121, 2007.

RIBAK, M. J.; LAPLANTE, K. L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. **Pharmacotherapy**, Paris, v. 25, no. 1, p. 74-85, 2005.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M. C. et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J. Clin. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 43, no. 4, p. 1985-1988, 2005.

RICARDO, S. B. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na comunidade. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n. 34, p. 131-134, 2004.

RICE, L. B.; THORISDOTTIR A. S. The prevalence of sequences homologous to IS256 in clinical enterococcal isolates. **Plasmid**, New York, v. 32, p. 344-349, 1994.

SAIID-SALIM, B.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B. N. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v. 24, no 6, p. 451-455, 2003.

SALGADO, M.M.; PIGNATARI, A.C.C.; BELLINATI-PIRES, R. Phagocytosis and killing of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by human neutrophils and monocytes. **Braz. J. Infec. Dis.**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 80-89, 2004.

SANCHES, I. S.; LESKI, T.; OLIVEIRA, D. et al. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 36, no. 12, p. 3532-3539, 1998.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, B. M. O.; DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de Hospital Universitário. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 160-172, 2002.

SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P. I.; BLUESTONE, R. et al. High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. **New Engl. J. Med.**, Waltham, v. 288, p. 704-706, 1973.

SEFTON, A. M. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. **Drugs**, London, v. 62, no. 4, p. 557-66, 2002.

SERHAT, U.; HOSKINS, J.; FLOKONITS, J. E. et al. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococci* by Using the Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Berlin, v. 30, no. 7, p. 1686- 1691, 1992.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M. O. et al. (Org.). **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília, DF: Ed. da UnB, 2003.

SILVA, N. B.; RAVANELLO, L. M. Controle de infecção hospitalar em terapia intensiva de adultos. In: COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. **Infecção hospitalar e outras implicações não-infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento**. 3. ed. São Paulo: Medsi, 2003. cap. 32, p. 609-616.

SINGH, R.; KAUL, R.; KAUL, A. et al. A comparative review of HLA association with hepatitis B and C viral infections across global populations. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 28, p.1770-1787, 2007.

SIRIPOMMONGCOLCHAIN, T. et al. Evolution of different primers for detecting *mecA* genes by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**, Bangkok, v. 33, no. 4, p. 758-763, 2002.

SOMMERÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 96, p. 91-102, 2003.

SOUSA, M. A.; SANCHES, I. S.; VAN BELKUM, A. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods. **Microb. Drug. Resist.**, Larchmont, v. 2, no. 3, p. 331-341, 1996.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Rev. Patol. Trop.** Goiania, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2008.

SPICER, W. J. **Bacteriologia, micologia e parasitologia clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science Progress**, Oxford, v. 85, v. 1, p. 57-72, 2002.

STEVENS, D. L.; MA, Y.; SALMI, D. B. et al. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 195, p. 202-211, 2007.

SVEJGAARD, A. HLA and disease. In: ROSE, N. R.; FRIEDMAN, H.; FAHREY, J. L. (Ed.). **Manual of clinical laboratory immunology**. 3rd ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1986. p. 912-920.

SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L. P. et al. HLA and disease associations - A Survey. **Transplant Rev.**, Copenhagen, v. 22, p. 3-43, 1975.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. **Tissue Antigens.**, Copenhagen, v. 43, p. 18-27, 1994.

TAMMELIN, A. et al. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in staff at a Department for Thoracic and Cardiovascular Surgery: endogenous or exogenous source? **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 24, p. 686-689, 2003.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antibióticos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Volta Redonda, v. 33, n. 3, p. 281-301, maio/jun. 2000.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 32, p. 407-415, 1994.

TENOVER, F. C. et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v.18, no. 6, p. 426-439, 1997.

TERASAKI, P. I.; McCLELLAND, J. D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**, Paris, v. 204, p. 998-1000, 1964.

TIWARI, J. L.; TERASAKI, P. I. Mechanisms of HLA and disease associations. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **HLA & disease association**. New York: Springer-Verlag, 1985. p. 28-31.

TODA, E. N. **Estudo da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* isolado no Laboratório Central da Santa Casa de São Paulo, no período de setembro/2000 a março/2002**. 2003. 106 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2003

TOLEDO, M. R. F. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. p. 105-109.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Bactérias. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TURNER, D. The human leucocyte antigen (HLA) system. **Vox Sang.**, Basel, p. 87-90, 2004. Supplement 1.

TYLER, K. D. et al. Complementary factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, Atlanta, v. 35, no. 2, p. 339-346, 1997.

UETA, M.; TOKUNAGA, K.; SOTOZONO, C. et al. HLA Class I and II gene polymorphisms in Stevens-Johnson syndrome with ocular complications in Japanese. **Mol. Vis.**, Atlanta, v. 14, p. 550-555, 2008.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, D. C., v. 28. no. 3, p. 397-403, 1985.

VAN BELKUM, A.; KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W. et al. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 33, no. 6, p. 1537-1547, 1995.

VANDENBERGH, M. F. Q.; VERBRUGH, H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 133, no. 6, p. 525-534, 1999.

VAN LEEUWEN, W. B.; MELLES, D. C.; ALAIDAN, A. et al. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 187, p. 4584-4591, 2005.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H. et al. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus species* by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 33, no. 11, p. 2864-2867, 1995.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes. **Nucl. Acids Res.**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, D. C., v. 99, p. 10102-10107, 2002.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. **New Engl. J. Med.**, Boston, v. 344, no. 1, p. 11-16, 2001.

WALFORD, R. L.; FINKELSTEIN, S.; NEERHOUT, R. et al. Acute childhood leukemia in relation to the HLA human transplantation genes. **Nature**, [S. 1.], v. 231, p. 461-462, 1970.

WEI, M. Q.; UDO E. E.; GRUBB, W. B. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with IS256. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 99, p. 175-180, 1992.

WERTHEIM, H. F.; VOS, M. C.; OTT, A. et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet**, Minneapolis, v. 364, p. 703-705, 2004.

WERTHEIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 5, p. 751-762, 2005.

YEO, S. W. et al. Distribution of HLA-A,-B and -DRB1 alleles in patients with sudden sensorineural hearing loss. **Acta Otolaryngol.**, London, v. 120, no. 6, p. 710-715, 2000.

## APÉNDICE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO ENFERMAGEM E MICROBIOLOGIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Maringá...../...../.....**

Pelo presente instrumento, eu..... declaro que fui suficientemente informado (a) sobre os objetivos das pesquisas intituladas “*Avaliação fenotípica, genotípica e fatores de virulência de amostras de Staphylococcus spp isoladas de pacientes sob tratamento dialítico e transplantados renais*” coordenadas pelos professores João Bedendo e Sueli Donizete Borelli. Declaro também que fui informado (a) sobre a garantia de sigilo e privacidade das informações cadastrais e resultados da pesquisa, liberdade de recusa em participar da pesquisa e também quais os procedimentos necessários à coleta de material biológico (secreção nasal). Desta forma voluntariamente CONSENTO na coleta de material biológico para o presente estudo cujo resultado poderá ser repassado, se necessário, ao médico responsável pelo meu tratamento.

---

----- Assinatura do pesquisado

Eu, Prof. \_\_\_\_\_, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao investigado.

\_\_\_\_\_ Assinatura do pesquisador

Contato. Departamento de Enfermagem bloco 01 - Fone: 3261-4511

---

**ANEXO**



Fundação Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

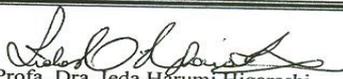
CAAE N°. 0043.0.093.000-09

PARECER N°. 212/2009

<b>Pesquisador (a) Responsável: João Bedendo</b>
<b>Centro/Departamento: Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Enfermagem</b>
<b>Título do projeto:</b> "Avaliação fenotípica, genotípica e fatores de virulência de amostras de Staphylococcus spp isolados de pacientes sob tratamento dialítico: estudo de associação com marcadores genéticos (HLA)"
<b>Considerações:</b> <p>O presente protocolo de pesquisa, que tem como objetivo geral "Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de Staphylococcus aureus e Staphylococcus coagulase negativos isolados de pacientes sob tratamento dialítico, bem como avaliar a correlação entre a tipagem HLA destes pacientes e a condição de colonização nasal por Staphylococcus aureus", foi apreciado em primeira submissão, tendo restado pendente na reunião de 27 de março de 2009, conforme parecer 160/2009-COPEP.</p> <p>Em resposta às pendências apontadas por este comitê o pesquisador envia os seguintes documentos /esclarecimentos para avaliação ética:</p> <p>Pendência 1 – O parecer solicitou indicar o local onde as amostras serão processadas.</p> <p>O pesquisador refere que as amostras serão processadas em dois laboratórios pertencentes à Instituição: Laboratório de Microbiologia da UEM e Laboratório de Imunologia Básica. Tais informações foram acrescentadas ao corpo do protocolo, na seção Metodologia. Considera-se a pendência atendida.</p> <p>Pendência 2 – o parecer solicita incluir declaração do laboratório ou do chefe de departamento apontando ciência do objeto de pesquisa.</p> <p>O pesquisador apresentou carta de autorização da Chefia do Departamento de Enfermagem, ao qual o mesmo é vinculado (departamento de lotação do pesquisador). Contudo, considerando que os laboratórios que processarão as análises pertencem a outro departamento (Departamento de Análises Clínicas), que não o de enfermagem, solicita-se incluir a autorização da Chefia daquele departamento, ou dos coordenadores dos laboratórios a serem utilizados. Considera-se a pendência parcialmente atendida.</p> <p>Pendência 3: foi solicitada a substituição da autorização do responsável pelo serviço de hemodiálise do Hospital Santa Casa, previamente apresentado, por outro devidamente identificado com o timbre da instituição. No mesmo item foram observadas as necessidades de correção do modelo de TCLE apresentado, em que pese a necessidade de informações acerca da pesquisa com dados genéticos e ponderação de riscos versus benefícios da pesquisa.</p> <p>O documento de autorização foi devidamente substituído. O pesquisador procedeu à reformulação do TCLE, contemplando as informações no tangente ao braço genético da pesquisa (esclarecimento no próprio TCLE de que não se trata de estudo de genética humana, uma vez que investigar-se-á a genética da bactéria S. aureus. Há observação ainda no termo de que o perfil HLA e CPH dos pacientes será obtido dos registros já existentes no serviço, visto tratarem-se de avaliações indicadas pela rotina aos pacientes transplantados ou na fila de espera para transplante, que constituem-se sujeitos da pesquisa em tela). O novo modelo de TCLE faz devida ponderação entre riscos e benefícios da participação no estudo, bem como atende as demais disposições fixadas pela Res. 196/96-CNS. Face ao exposto, considera-se a pendência atendida.</p> <p>Considerando a apreciação ética dos aspectos acima detalhados, somos de parecer favorável à aprovação do protocolo, sugerindo ao pesquisador que apresente nova carta de autorização (da Chefia Departamental que abriga os laboratórios a serem utilizados), para que o referido documento seja devidamente arquivado com o restante do protocolo. Ademais, e anteriormente ao início do estudo, o pesquisador deverá providenciar a troca da Folha de Rosto, em que consta classificação indevida (equivocada) do protocolo, enquanto pesquisa de área temática I – Biossegurança – classificação esta que não se aplica à proposta em tela).</p>
<b>Situação: APROVADO</b>



*Fundação Universidade Estadual de Maringá*  
*Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação*  
*Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos*

CONEP: <input checked="" type="checkbox"/> para registro <input type="checkbox"/> para análise e parecer		Data: 22/5/2009
Relatório Final para Comitê: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim		Data: maio de 2011
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução n°. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 174ª reunião do COPEP em 22/5/2009.	 Prof. Dra. Ieda Harumi Higashi Presidente do COPEP	