

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

NAYARA CARVALHO SILVA

**DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS  
DE INFECÇÕES MAMÁRIAS HUMANAS**

VITÓRIA

2020

NAYARA CARVALHO SILVA

**DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS  
DE INFECÇÕES MAMÁRIAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S586d Silva, Nayara Carvalho, 1992-  
Detecção de genes de virulência e caracterização genética de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina isolados de infecções de mama em humanos / Nayara Carvalho Silva. - 2020. 83 f. : il.

Orientador: Ricardo Pinto Schuenck.  
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Staphylococcus aureus resistente à meticilina. 2. Infecções mamárias. 3. Epidemiologia. 4. USA300. I. Schuenck, Ricardo Pinto. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas**

Vitória, 10 de dezembro de 2020.

**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**MESTRADO**

O(a) mestrando(a) Nayara Carvalho Silva apresentou a tese intitulada “Detecção de genes de virulência e caracterização genética de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados de infecções mamárias” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu ( **X** ) aprovar ( ) reprovar a dissertação habilitando Nayara Carvalho Silva a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Fernanda Sampaio Cavalcante  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Titular Externo

Prof. Dr. Moises Palaci  
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Nayara Carvalho Silva  
Discentes



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me sustentado e permitido que eu tivesse saúde e determinação para alcançar meus objetivos durante todos os meus anos de estudos.

Aos meus pais, que me incentivaram nos momentos mais difíceis e compreenderam a minha ausência e mau humor enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, em especial Maralisi e Caroline, que se mostraram verdadeiras amigas até mesmo quando eu estava insuportável. Obrigada pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo dos anos.

Ao professor Ricardo Schuenck, por ter aceitado me orientar e contribuir para meu processo de formação profissional. Não tenho palavras para agradecer todo ensinamento, paciência e compreensão que teve comigo ao longo desses anos. Muito obrigada!

Aos meus colegas, antigos e novos, do LabCAS, Resbac e LabViG por todo companheirismo, cafés, risadas, choros e bolos durante esses anos.

Aos técnicos, antigos e novos, do Departamento de Patologia que sempre se mostraram dispostos a contribuir para o meu aprendizado.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas pela oportunidade de aprendizado.

Aos órgãos financiadores da minha pesquisa: CAPES, CNPq, FAPES e UFES.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigada!!!

## RESUMO

---

Diversos microrganismos são capazes de causar infecções na mama, contudo, *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais frequente, estando presente em cerca de 40 a 50% dos casos. Infecções causadas por *S. aureus* podem vir a tornarem-se mais graves em razão dos diversos genes de virulência que esta espécie pode carrear. O presente estudo teve como objetivo verificar a prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em infecções de mama de pacientes atendidas em um Hospital Universitário bem como pesquisar genes relacionados à virulência e caracterizar geneticamente estes isolados. A investigação foi realizada entre 2017 e 2019 e 75 pacientes foram arroladas no estudo. Os dados epidemiológicos das pacientes foram obtidos através dos registros em seus prontuários médicos. Os isolados foram submetidos a testes de susceptibilidade e testes moleculares para tipagem do SCCmec, do gene que codifica a proteína A e para determinar a relação genética entre as amostras. MRSA foi isolado em 43 (54,4%) casos. As amostras foram susceptíveis a maioria dos antimicrobianos testados, com exceção à ampicilina, ciprofloxacina, levofloxacina e eritromicina. O SCCmec IV foi detectado em todos os isolados, com prevalência do subtipo IVa (90,6%). Os genes que codificam a toxina PVL foram detectados em todos os isolados, bem como os genes *clfA* e *clfB*. Foi observada uma alta frequência de hemolisinas, sendo 93% dos isolados positivos para os genes *hla*, *hld* e *hlg-2*. O gene *fnbB* foi detectado em 81,3% e *cna* em 37,2% dos isolados. Os 43 isolados apresentaram apenas três pulsotipos geneticamente distintos (A-C), sendo 40 pertencentes ao pulsotipo A, que apresentou quatro subtipos (A1-A4). Amostras deste pulsotipo apresentaram o ST8 e seis tipos de *spa type*: t008, t1405, t1451 e t1767, sendo prevalente o t008 (36 amostras). O perfil genético dos isolados do pulsotipo A foi compatível com o denominado clone USA300. Este é o primeiro estudo a descrever a disseminação do clone USA300 PVL-positivo em infecções mamárias no Brasil. A presença de PVL e hemolisinas em infecções mamárias é preocupante e pode contribuir para o agravamento da infecção. Nenhuma relação epidemiológica aparente foi identificada entre as pacientes, deste modo, alguns hospitais/maternidades podem estar servindo como fontes para disseminação destes isolados que estão circulando na comunidade.

**Palavras-chave:** Infecções mamárias; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; USA300; epidemiologia.

## ABSTRACT

---

Several microorganisms can cause infections in the breast, however, *Staphylococcus aureus* is the most frequent pathogen, being present in about 40 to 50% of cases. Infections caused by *S. aureus* can become more serious due to the different virulence genes that it can carry. The present study aimed to verify the prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in breast infections of patients treated at a University Hospital, as well as to detect virulence-related genes and to genetically characterize these isolates. The investigation was carried out between 2017 and 2019 and 75 patients were included. The epidemiological data of the patients were obtained through the records in their medical records. The isolates were subjected to susceptibility tests and molecular tests to type the *SCCmec*, the gene that encodes protein A, and to determine the genetic relationship between the isolates. Forty-three MRSA were identified. The isolates were susceptible to most of the tested antimicrobials, with the exception of ampicillin, ciprofloxacin, levofloxacin, and erythromycin. *SCCmec* IV was detected in all isolates with a prevalence of subtype IVa (90.6%). The genes encoding the PVL toxin were detected in all isolates, as well as the *clfA* and *clfB* genes. A high frequency of hemolysins was observed in the isolates, 93% positive for the *hla*, *hld* and *hlg-2* genes. The *fnbB* gene was detected in 81.3% and *cna* in 37.2% of the isolates. The 43 isolates showed only three genetically distinct pulsotypes (A-C), 40 of which belong to pulsotype A, that presented four subtypes (A1-A4). Isolates of this pulsotype presented ST8 and six types of *spa*: t008, t1405, t1451, and t1767, with t008 being prevalent (36 isolates). The genetic profile of pulsotype A was compatible with the named USA300 clone. This is the first study to describe the spread of the USA300 PVL-positive clone in breast infections in Brazil. The presence of PVL and hemolysins in breast infections is a cause for concern and may contribute to the worsening of the infection. No apparent epidemiological relationship has been identified among the patients, thus, some hospitals/maternity hospitals may be serving as sources for the dissemination of these isolates to the community.

**Keywords:** Breast infections; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; USA300; epidemiology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACME - Elemento móvel catabólico da arginina  
AIDS - Síndrome da imunodeficiência humana  
AMP - Ampicilina  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
arc - Quinase de carbamato  
aroE - Desidrogenase quimato  
bbp - Proteína de ligação à sialoproteína óssea  
C5a - Componente C5 do complemento  
CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado à comunidade  
CC - Complexo clonal  
ccr - complexo gênico *ccr*  
CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças  
CIP - Ciprofloxacina  
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CMI - Concentração Mínima Inibitória  
cna - Proteína ligadora de colágeno  
COMER - elemento móvel de resistência a cobre e mercúrio  
DAP - Daptomicina  
dATP - DesoxiAdenosina Trifosfatada  
dCTP - DesoxiCitidina Trifosfatada  
dGTP - DesoxiGuanosina Trifosfatada  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
dTTP- DesoxiTimidina Trifosfatada  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
ERI - Eritromicina  
ESKAPE- acrônimo que compreende os nomes científicos das bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.  
eta - Toxina exfoliativa A  
etb - Toxina exfoliativa B



EUA - Estados Unidos da América

fnbb - Proteína B ligadora de fibronectina

GEN - Gentamicina

glpF - Glicerol quinase

gmK - Guanilato quinase

h - Horas

HA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado aos cuidados da saúde

HCL - Ácido clorídrico

hla - Alfa-hemolisina

hlb - Beta-hemolisina

hld - Delta-hemolisina

hlg - Gama-hemolisina

hlg2 - Gama-hemolisina-variante

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes

IsdA - Proteína A de superfície regulada por ferro

KCl - Cloreto de potássio

LEV - Levofloxacina

M - Molar

Mm - Milimolar

*mecA* - Gene codificador da proteína PBP2a

*mecC* - Gene codificador da proteína PBP2c

*mecR1* - Indutor da transcrição do gene *mecA*

*medl* - Repressor da transcrição do gene *mecA*

min - Minuto

Mg<sup>+</sup> - Magnésio

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

mL - Mililitro

MLST - *Multilocus Sequence Type*

mm - Milímetro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

NaCl - Cloreto de sódio

*orf* - Quadro aberto de leitura

pb - Pares de bases

PCR - Reação da Cadeia da Polimerase

PFGE - Eletroforese em gel de campo pulsado

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMN - Células polimorfonucleares

pUSA02 e pUSA03 - Plasmídeos responsáveis pela resistência à tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, estreptogramina B e mupirocina

p/v - peso por volume

PVL - Leucocidina de Pantón-Valentine

opp3 - Sistema de permeação de oligopeptídeos

OSPC - Clone da Oceania e Sudoeste do Pacífico

OXA - Oxacilina

SCC*mec* - Cassete estafilocócico cromossômico *mec*

sdrD - Proteína D contendo a repetição de serina-aspartato

sdrE - Proteína E contendo a repetição de serina-aspartato

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

spa - Proteína A

SAK - Estafiloquinase

SEK - Enterotoxina K

tpi - Triosefosfato

SEQ - Enterotoxina Q

ST - *Sequence Type*

TSB - Caldo soja tripticaseína

TSST- Toxina da síndrome do choque tóxico

UFC - Unidade formadora de colônia

µg - Micrograma

µL - Microlitro

USA300-LV - Variante latino-americana do clone USA300

USA300-NAE - Linhagem epidêmica norte-americana do clone USA300

USA300-SAE - Linhagem epidêmica sul-americana do clone USA300

V - Volts

VAN - Vancomicina

VNTR - Repetição em tandem de número variável

Xr - Região X da proteína A

yqiL - AcetilCoAacetiltransferase

WGS - Sequenciamento de genoma completo

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcento

$\beta$  - Beta

$\leq$  - Menor ou igual

$^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius

$>$  - Maior

$\geq$  - Maior ou igual

$<$  - Menor

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Lâmina de Gram evidenciando o formato esférico e o arranjo dos cocos e <i>Staphylococcus aureus</i> cultivado em ágar sangue.....	18
Figura 2:	Tipos, estruturas e classificação de 13 tipos de SCCmec e seus complexos.....	22
Figura 3:	Taxas de resistência à meticilina em amostras hospitalares de <i>Staphylococcus aureus</i> no mundo.....	24
Figura 4:	Ilustração do gene <i>spa</i> e região X.....	25
Figura 5:	Distribuição geográfica dos clones de MRSA no mundo.....	28
Figura 6:	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> (estruturais e secretados).....	31
Figura 7:	Foto ilustrativa da eletroforese para detecção do gene <i>nuc</i> .....	53
Figura 8:	Foto ilustrativa da eletroforese para tipagem do SCCmec IV.....	55
Figura 9:	Foto ilustrativa da eletroforese para subtipagem do SCCmec IV.....	55
Figura 10:	Foto ilustrativa da eletroforese para detecção dos genes <i>clfA</i> e <i>clfB</i> .....	56
Figura 11:	Foto ilustrativa da eletroforese para detecção dos genes codificadores da PVL.....	57
Figura 12:	Foto ilustrativa da eletroforese para detecção do gene <i>cna</i> .....	57
Figura 13:	Foto ilustrativa da amplificação do gene que codifica a proteína A.....	58
Figura 14:	Características moleculares e fenotípicas das 43 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina avaliadas neste estudo.....	60

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
Quadro 2: Principais proteínas ancoradas à parede celular de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
Quadro 3: Toxinas secretadas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
Quadro 4: Informações coletadas dos prontuários médicos das pacientes do estudo.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação, sequência nucleotídica, especificidade dos oligonucleotídeos e tamanhos dos amplicons da reação de PCR-multiplex para tipagem do cassete cromossômico <i>mec</i> das amostras deste estudo..	42
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para subtipagem do SCC <i>mec</i> IV.....	43
Tabela 3: Sequências nucleotídicas e amplicons dos genes relacionados à virulência investigados neste estudo.....	45
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados e amplicons gerados na tipagem do gene da proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
Tabela 5: Descrição das sequências nucleotídicas utilizadas na realização do MLST.....	49
Tabela 6: Dados demográficos coletados das 43 pacientes deste estudo.....	52
Tabela 7: Determinação da concentração mínima inibitória para oxacilina, vancomicina e daptomicina das amostras analisadas neste estudo.....	54
Tabela 8: Perfil alélico, <i>sequence type</i> e complexo clonal das três cepas analisadas.....	59

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 43 amostras de *Staphylococcus aureus* do estudo..... 54
- Gráfico 2: Frequência dos genes de virulência investigados nas 43 amostras deste estudo..... 56



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	20
Epidemiologia e fatores de virulência de <i>S. aureus</i> com ênfase na linhagem MRSA - USA300 .....	24
A importância de <i>Staphylococcus aureus</i> nas infecções de mama.....	33
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Delineamento, local do estudo e amostras bacterianas.....	37
4.1.1 Aspectos éticos e legais.....	38
4.2 Coleta de dados.....	38
4.3 Confirmação molecular das amostras bacterianas.....	38
4.3.1 Extração do DNA bacteriano.....	39
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do gene <i>nuc</i> .....	39
4.4 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	40
4.5 Tipagem do cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ).....	41
4.6 Subtipagem do SCC <i>mec</i> IV .....	42
4.7 Detecção dos genes relacionados à virulência .....	43
4.8 Digestão do DNA cromossômico com uso da enzima de restrição <i>Sma</i> I e separação em gel por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	45
4.9 Tipagem do gene que codifica a proteína A ( <i>spa</i> typing).....	47
4.10 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	48

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

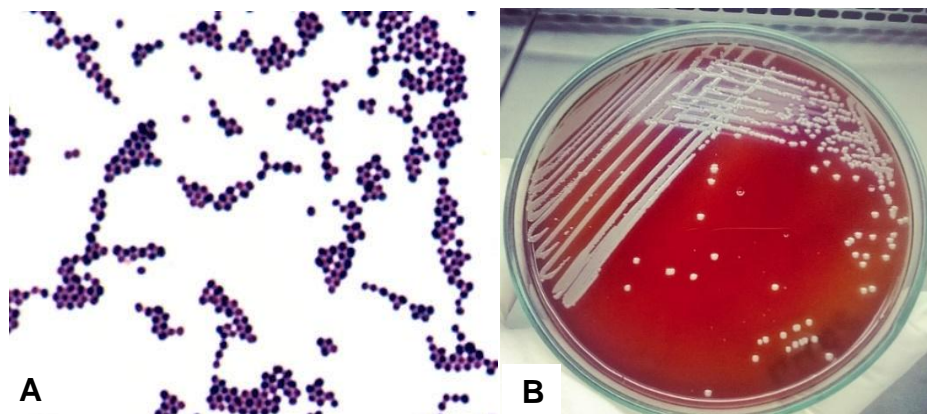
O leite materno é considerado o alimento mais completo para o recém-nascido. Composto por água, carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e sais minerais, faz-se de extrema importância para o suprimento das suas necessidades nutricionais. No entanto, a amamentação vai além de prover nutrição, pois, durante o aleitamento, a nutriz também fornece anticorpos e imunomoduladores responsáveis pelo desenvolvimento do sistema de defesa do neonato. Além dos benefícios supracitados, a amamentação promove o fortalecimento do vínculo afetivo entre mãe e filho, sendo este, indiretamente responsável pelo desenvolvimento psicossocial do bebê. Neste contexto, quando se aborda a saúde da mulher, as mamas possuem um papel de grande importância em razão das diversas enfermidades que as acometem, como mastites e câncer. As afecções que mais comprometem as mamas são as de caráter inflamatório, como as mastites, que podem levar a abscessos. Estas enfermidades são comumente iniciadas por microrganismos comensais do corpo humano e seu tratamento é dificultado pela resistência à adesão da paciente ao tratamento, por medo de comprometer a saúde do recém-nascido. Várias espécies de microrganismos podem estar associadas ao desenvolvimento de mastites e abscessos, dentre elas *Staphylococcus aureus* é o mais prevalente, estando presente em cerca de 40 a 50% dos casos. Além de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* do grupo B, enterobactérias, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas* spp. e *Candida* spp. também podem ser responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de infecção. Estudos acerca da caracterização de aspectos genéticos dos agentes causadores de infecções de mama em humanos não são tão comuns em nosso país. Neste contexto, o presente estudo propõe-se a caracterizar as linhagens e avaliar a presença de relevantes determinantes de virulência em isolados de *S. aureus* resistentes à metilina obtidos de infecções de mama de pacientes atendidas em um hospital público da cidade de Vitória-ES. Com esse estudo, esperamos contribuir para uma melhor compreensão em relação às características do principal agente desta infecção, bem como para prevenção, manejo e tratamento adequados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, descoberta em 1884 pelo cirurgião alemão Anton J. Rosenbach. A etimologia do nome *Staphylococcus aureus* vem do grego *staphyle* (de “cachos de uva”), *kokkos* (de “grão, semente”) e *aureus* (de “ouro”), referindo-se ao modo como as bactérias se encontram agrupadas, a forma esférica da bactéria e sua cor amarelo-ouro (SCHLEIFER & BELL, 2015).

Em meio de cultura sólido, as colônias de *S. aureus* costumam medir de 1 a 2 mm de diâmetro, possuem formato arredondado, são lisas, elevadas, apresentam textura cremosa e coloração que pode variar do cinza claro ao amarelo-dourado (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Em ágar sangue esta espécie mede entre 0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$ , é imóvel, anaeróbia facultativa, não fotossintética, não esporulada, é produtora das enzimas coagulase e catalase, apresenta metabolismo fermentativo com produção de ácido e é capaz de crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio. A faixa de temperatura de crescimento é bem ampla, variando de 7 a 48°C, sendo de 30 a 37°C a faixa de temperatura ótima para seu crescimento (KLOOS & BANNERMAN, 1999; SCHLEIFER & BELL, 2015). Tais características permitem que *S. aureus* colonize uma variedade de sítios como água, alimentos, solo e animais de sangue quente (GORBACH, 1996).



**Figura 1:** a. Lâmina de uma coloração de Gram evidenciando o formato esférico e o arranjo dos cocos (Fonte: <https://bit.ly/2ZCHhRS>); b. *Staphylococcus aureus* cultivado em ágar sangue (Fonte: arquivo pessoal).

*S. aureus* é um microrganismo comensal do ser humano e pode ser comumente encontrado na epiderme e fossas nasais, sítio considerado reservatório

natural desta bactéria. Estima-se que, aproximadamente, 30% da população mundial seja portadora persistente desta bactéria e outros 30% sejam portadores intermitentes. Muitos estudos apontam que a colonização por *S. aureus* aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de infecções comunitárias e nosocomiais (REBOLLO-PEREZ et al., 2011; LAKHUNDI & ZHANG 2018, BUCHAN et al., 2019; LEE et al., 2018).

*S. aureus* é responsável por causar uma grande quantidade de doenças (Quadro 1), variando desde infecções mais simples de pele e tecidos moles, como furúnculos e espinhas, a infecções graves, como pneumonia necrotizante, endocardite, osteomielite e sepse (TONG et al., 2015; DAYAN et al., 2016; BUCHAN et al., 2019; TURNER et al., 2019).

**Quadro 1:** Principais infecções causadas por *Staphylococcus aureus*.

Infecções cutâneas	Infecções sistêmicas	Infecções mediadas por toxinas
Celulite	Artrite séptica	Intoxicações alimentares
Espinhas	Empiema	Síndrome do choque tóxico (SST)
Foliculite	Endocardite	Síndrome da pele escaldada estafilocócica
Furúnculos	Sepse	
Feridas	Abscessos musculares e cerebrais	
Impetigo	Meningite	
	Osteomielite	
	Pneumonia	

Na prática clínica, cepas de origem comunitária são aquelas diagnosticadas em pacientes ambulatoriais ou sem fatores de riscos pré-estabelecidos como: cateter permanente, ter passado por internação de longa duração no último ano ou ter sido submetido à hemodiálise ou cirurgia (GORWITZ et al., 2006; FIGUEIREDO, 2017). A portaria nº 2.616 do Ministério da Saúde define infecção de origem comunitária como:

- I. “é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital.
- II. a infecção que está associada com complicação ou extensão da infecção já presente na admissão, a menos que haja troca de microrganismos com sinais ou sintomas fortemente sugestivos da aquisição de nova infecção;
- III. a infecção em recém-nascido, cuja aquisição por via transplacentária é conhecida ou foi comprovada e que tornou-se evidente logo após o

- nascimento (exemplo: herpes simples, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose, sífilis e AIDS);
- IV. as infecções de recém-nascidos associadas com bolsa rota superior a 24 (vinte e quatro) horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).”

Cepas de origem hospitalar, por sua vez, estão diretamente relacionadas aos cuidados da saúde e se manifestam durante ou após procedimentos hospitalares e/ou internação (ANVISA, 2020). Segundo a portaria nº 2616 do Ministério da Saúde (1998) é definida como infecção de origem hospitalar “aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. ”

Anteriormente, cepas de origem hospitalar e comunitária podiam ser bem diferenciadas molecularmente, onde cepas originadas nos hospitais apresentavam resistência de muitas classes de antimicrobianos, ao passo que cepas de origem comunitária eram mais suscetíveis e, comumente, mais virulentas (JUNIE et al, 2018). No entanto, este cenário tem se modificado e cada vez mais cepas com características moleculares de origem comunitária têm sido encontradas no ambiente hospitalar (KLEVENS et al., 2006; TAYLOR et al., 2015).

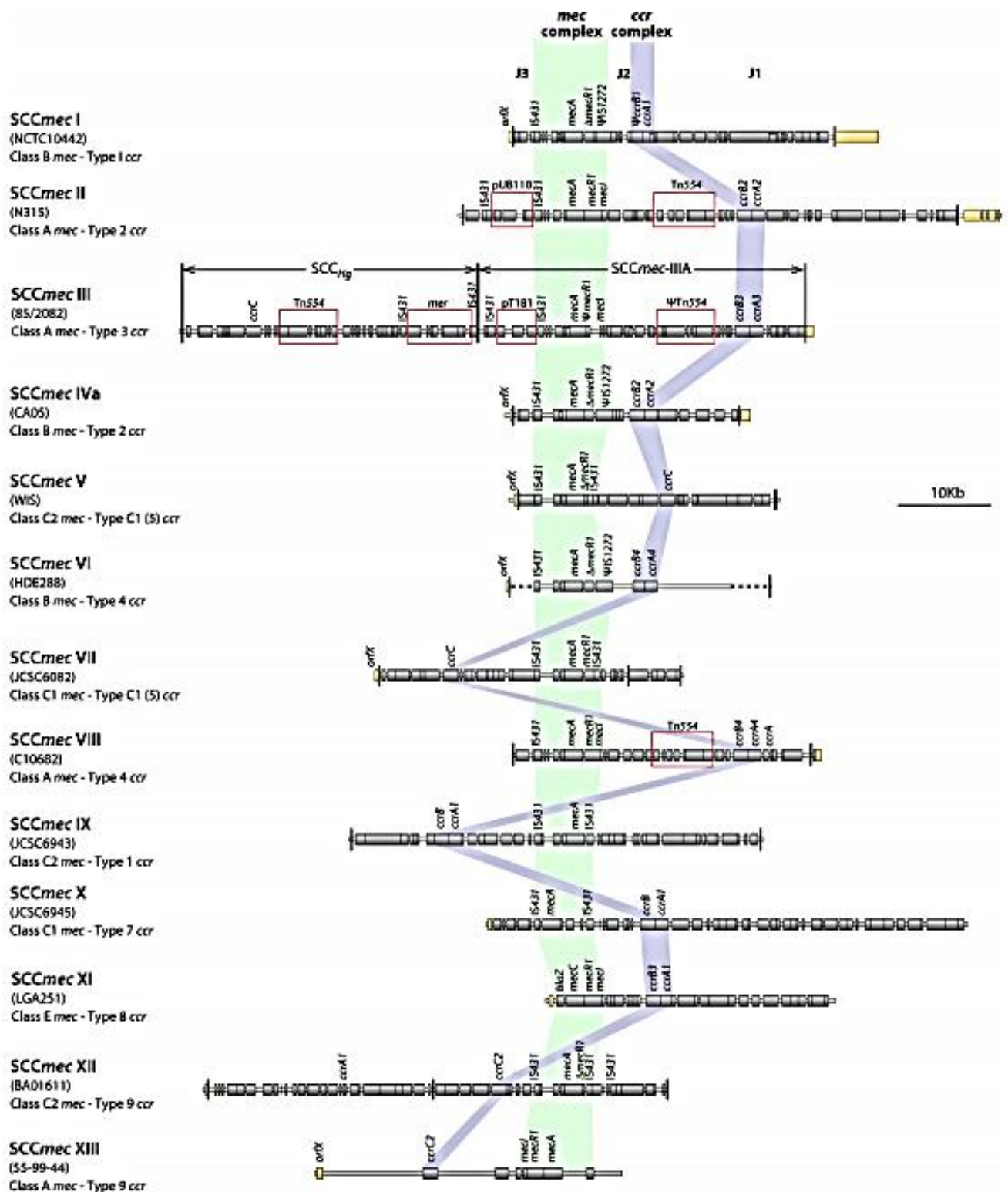
Há algumas décadas tem sido observado o aumento significativo da prevalência de *S. aureus* em todo mundo. Atualmente, este patógeno é considerado um grave problema de saúde pública. Estudo conduzido por PEREIRA-FRANCHI et al. (2017) em uma unidade básica de saúde em Botucatu-SP relatou a presença de *S. aureus* em 51,5% (88/171) dos casos de ferida crônica. No Brasil, a prevalência de *S. aureus* como agente de infecção hospitalar varia entre 14,5 a 70%, dependendo da região estudada (KLEIN & GOULART et al., 2008, BRATRA et al., 2010; OLIVEIRA & de PAULA, 2012; ANVISA, 2014; ANDRADE-FIGUEIREDO & LEAL-BALBINO, 2016; PEREIRA-FRANCHI et al., 2017; LA OSSA et al., 2018).

### ***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina**

*S. aureus* resistente à meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) é um grande problema de saúde pública em todo o mundo desde seu isolamento, em 1961, um ano após a inserção da meticilina como tratamento para infecções para esse agente (ITO et al., 2001; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; BHATTACHARYA, 2014; LAKHUNDI & ZHANG, 2018). A resistência à

metilina é atribuída ao gene *mecA* ou *mecC*, os quais expressam uma proteína ligante de penicilina alterada, a PBP 2a (*Penicillin Binding Protein 2a*) e PBP 2c (*Penicillin Binding Protein 2c*), respectivamente. A proteína PBP 2c é similar a PBP 2a em 63% de sua conformação (BALLHAUSEN et al., 2014). Estas proteínas atuam como transpeptidases que recuperam as funções de síntese da parede celular quando as outras PBPs estão bloqueadas e, deste modo, mantém a integridade da célula na presença de agentes beta-lactâmicos (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; KAISER et al., 2010; LAKHUNDI & ZHANG, 2018).

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec* - SCC*mec*). Atualmente, 14 tipos distintos de SCC*mec* estão descritos na literatura e são classificados do I ao XIV (Figura 2 – I ao XIII). Os tipos I - XI encontram-se descritos no site [sccmec.org](http://www.sccmec.org/joomla3/index.php/en/) (<http://www.sccmec.org/joomla3/index.php/en/>) enquanto os tipos XII, XII e XIV foram descritos nos trabalhos de KAYA et al. (2018), BAIG et al. (2018;) e URUSHIBARA et al. (2019), respectivamente. Apesar de mudanças ao longo dos anos, os tipos mais prevalentes ainda são: I, II e III para cepas de HA-MRSA (*Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), caracterizadas por serem multirresistentes, e IV e V para cepas CA-MRSA (*Community-Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*). Contudo, como mencionado anteriormente, há alguns anos registram-se amostras com características de CA-MRSA surgindo dentro das unidades de saúde e, por vezes, sendo o patógeno mais frequente (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; CHAMBERS & DELEO, 2009; DAVID & DAUM 2010; LIU et al., 2016).



**Figura 2:** Tipos, estruturas e classificação de 13 tipos de *SCCmec* e seus complexos. Caixas vermelhas evidenciando plasmídeos e transposons. Fonte: Lakhundi & Zhang (2018).

Além do gene responsável pela resistência à oxacilina, o *SCCmec* abriga outros genes e estruturas responsáveis pela atividade do elemento móvel. Os genes



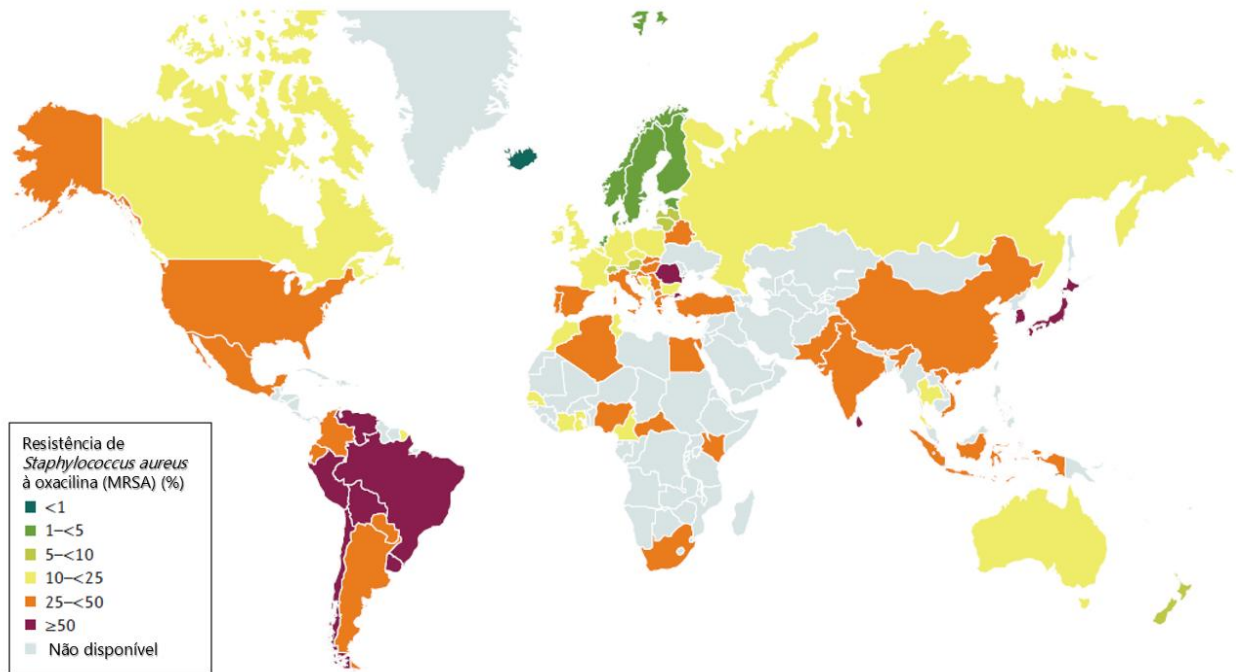
regulatórios *mecR1* e *mecI* são os responsáveis por induzir e reprimir a transcrição do gene *mecA*. Estes genes regulatórios estão localizados no complexo *mec*, o qual pode variar do A ao E, sendo os complexos A e C os mais comuns até o presente momento. Os genes *ccr* bem como as estruturas ORFs (do inglês: *open reading frame*) constituem o complexo *ccr*. Os genes *ccr* possuem a função de integrar e excisar o SCC*mec* do genoma bacteriano ao passo que as ORFs ainda não possuem função totalmente conhecida. Assim como o complexo *mec*, o complexo *ccr* também é subdividido, e, até o momento, possui nove complexos distintos (*ccrA* ao *ccrC* e suas variantes). Deste modo, o tipo SCC*mec* é determinado baseado nos complexos *mec* e *ccr* e os subtipos são determinados utilizando as regiões denominadas regiões J, as quais carregam genes acessórios de resistência a outros antimicrobianos ou resistência a metais pesados (Figura 2) (KAYA et al., 2018; BAIG et al., 2018; LAKHUNDI & ZHANG, 2018).

Frequentemente, infecções causadas por *S. aureus* são precedidas por colonização nasal, que pode ser identificada na admissão do paciente ou adquirida durante a internação (BANNERMAN, 2003; KLUYTMANS & STRUELENS, 2009). *S. aureus* faz parte do grupo denominado ESKAPE, que reúne os principais patógenos nosocomiais juntamente com *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Infecções causadas por MRSA são graves e potencialmente fatais, e ocorrem com maior frequência entre pacientes hospitalizados (CDC, 2020).

Diversos estudos apontam taxas de resistência a oxacilina em *S. aureus* bem variadas em hospitais por todo o mundo, com taxas que variam de 25 a ≥50% na Ásia, América do Norte e do Sul (Figura 3), contrastando com locais como a região da Escandinávia, onde a taxa é inferior a 5% (STEFANI et al., 2012; LEE et al., 2018). No Brasil, as taxas de MRSA também variam conforme região, no Centro-Oeste SILVA et al., 2017 relataram taxas de 40% (51/127) enquanto que na região Sudeste as taxas variam entre 43% (120/279) e 59,2 % (45/76) (LA OSSA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018).

Taxas de resistência à meticilina em amostras da comunidade vêm aumentando em várias regiões. Estudo conduzido em São Paulo por LA OSSA et al. (2018) obteve 279 isolados de *S. aureus* de diversos tipos de infecção e 161 foram

classificadas como infecções de origem comunitária, sendo 55 (34,1%) de CA-MRSA.



**Figura 3:** Taxas de resistência à metilina em amostras hospitalares de *Staphylococcus aureus* no mundo. Fonte: Adaptado de LEE et al. (2018).

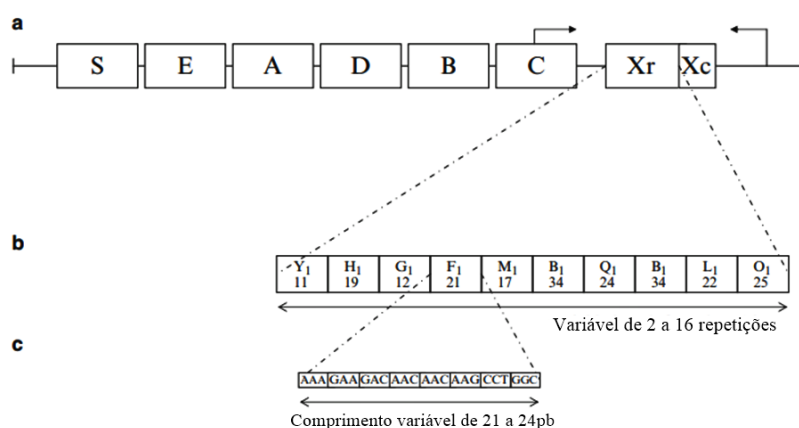
### **Epidemiologia e fatores de virulência de *S. aureus* com ênfase na linhagem MRSA - USA300**

Desde o advento da biologia molecular, diversas técnicas foram desenvolvidas para o estudo epidemiológico de microrganismos. A relevância de *S. aureus* como agente de diversas infecções contribuiu para uma busca de métodos capazes de caracterizar precisamente as linhagens circulantes, tornando possível distinguir e compreender a disseminação deste patógeno na comunidade e hospitais. Além de monitorar a disseminação e a circulação, os métodos de tipagem molecular são muito utilizados no estudo de eventos evolutivos. Atualmente, os métodos mais utilizados para tipagem de *S. aureus* são: tipagem SCCmec, tipagem do gene da proteína A (*spa typing*), clivagem do DNA cromossômico com enzima de restrição e posterior separação utilizando eletroforese de campo pulsado (do inglês:

*Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE*), *Multilocus Sequence Typing (MLST)* e sequenciamento completo do genoma (WGS).

A técnica de tipagem do SCC<sub>mec</sub> é baseada na identificação estrutural deste elemento genético. Essa identificação ocorre através da detecção dos elementos-chave *mec* e *ccr*. Em casos como o SCC<sub>mec</sub> do tipo IV é possível refinar a identificação utilizando a região J1 para subtipagem, potencializando o poder de discriminação. A tipagem e subtipagem costumam estar presentes em estudos de caracterização de amostras com esse cassete (MONACO et al., 2016).

A tipagem do gene da proteína A consiste no sequenciamento do gene que codifica a região X da proteína A de *S. aureus*. A região X é altamente polimórfica e possui diversas repetições *in tandem*. A combinação destas repetições determina o *spa type* (Figura 4) (HARMSEN et al., 2003). A utilização de um único *locus spa* permite indexar, simultaneamente, micro e macrovariações, tornando esta técnica uma boa escolha para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos locais e globais. Este método possui diversas vantagens técnicas como rapidez, reprodutibilidade e produção de resultados inequívocos que podem ser comparáveis entre laboratórios graças a utilização de nomenclatura padrão e de bancos de dados *online*. Segundo o *Ridom SpaServer* (banco de dados *spa type*), até o presente momento, foram relatadas 807 repetições e 19.600 *spa types* distintos em todo o mundo.



**Figura 4:** Imagem ilustrativa do gene *spa* e região X. **a)** Esquema do gene *spa*. Xr é a região de VNTR (repetição *in tandem* de número variável). **b)** Modelo exemplificando as repetições da região Xr (no exemplo está ilustrado o *spa type* t008 sob duas nomenclaturas: *Ridom-Harmsen* e colaboradores [numérica inferior] e *Kreiswirth*). **c)** Comprimento das repetições. Fonte: adaptado de HALLIN, FRIEDRICH & STRUELENS, 2009.

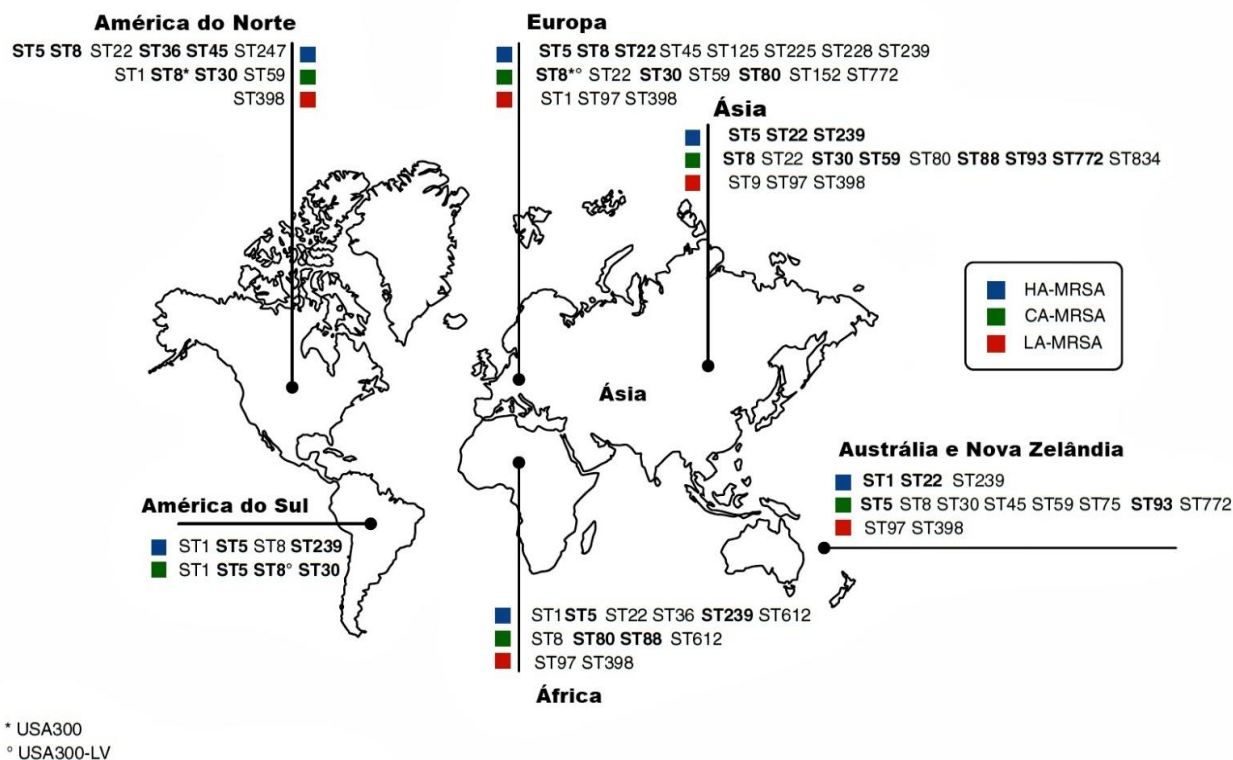
Antes do desenvolvimento de técnicas baseadas em sequenciamento, a clivagem do DNA cromossômico com enzima de restrição e posterior separação utilizando eletroforese de campo pulsado (PFGE) se tornou a técnica padrão-ouro na discriminação de bactérias (TENOVER, 1997). Descrito pela primeira vez em 1984, este método é amplamente utilizado até os dias atuais, em razão do seu alto poder discriminatório. Muito empregado no estudo de surtos, o PFGE consiste em aprisionar o DNA em “plugs” de agarose e clivá-lo em sítios específicos utilizando enzima de restrição, no caso de *S. aureus* a enzima utilizada é a *SmaI*. Após clivagem são gerados de 10 a 30 fragmentos que variam entre 10 e 800Kb de tamanho. Estes fragmentos são submetidos a eletroforese de campo alternado, promovendo a migração dos fragmentos de forma serpentiforme no gel. Ao final desse processo, visualiza-se o padrão de fragmentação de cada amostra. A análise desses padrões é realizada visualmente ou utilizando *softwares* como *Bionumerics* e *Gel J* que comparam e agrupam os padrões baseado na similaridade entre eles. Infelizmente, esta técnica não conta com uma base de dados a nível mundial como *spa typing* ou MLST, dificultando a comparação dos padrões de fragmentação entre os laboratórios. Os principais clones MRSA dos EUA e de outros países constam na base de dados *Pulsenet* (<https://www.cdc.gov/pulsenet/index.html>).

Baseado no sequenciamento de sete genes *housekeeping*, o MLST foi descrito pela primeira vez por Maiden et al. (1998) propondo um método discriminatório que superasse os problemas de reprodutibilidade entre laboratórios. As sequências obtidas são analisadas em *software* e comparadas com as depositadas no banco de dados disponível em <http://saureus.mlst.net>. Cada alelo recebe uma numeração e o conjunto dos sete alelos dá origem a um *sequence type* (ST). O MLST é empregado para diversos tipos de estudos: estrutura populacional, filogenia, evolução, macro-epidemiologia, entre outros, possibilitando analisar a diversidade genética em diferentes regiões no mundo.

Nos últimos anos, a técnica de sequenciamento de genoma completo (WGS) vem substituindo as demais tipagens citadas anteriormente. Sequenciar todo o genoma oferece os melhores resultados possíveis para os estudos sobre similaridade, resistência e virulência (MONACO et al., 2016). O tamanho do genoma de *S. aureus* varia entre 2,6 a 3,1Mb e 15 a 20% são elementos móveis (TAGINI & GREUB, 2017). Além de promover uma melhor compreensão dos elementos que

compõem o genoma, o WGS também já foi utilizado com sucesso para detecção de surtos de MRSA em UTI neonatal, utilizando análise de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) para diferenciar cepas de surto das demais (KOSER et al., 2012b; HARRIS et al., 2013).

A maioria dos estudos epidemiológicos com *S. aureus* trata de linhagens de MRSA e demonstram que as mesmas estão em constante evolução em decorrência da globalização e que, em determinados momentos, linhagens antigas tornam a reaparecer. O primeiro MRSA, surgido nos anos 60, denominado clone arcaico (ST250, CC8) começou a desaparecer na década de 80, dando lugar a outros clones, como o clone brasileiro (ST239, SCC*mec* III). Este clone foi o mais prevalente nos EUA, Austrália e Reino Unido na década de 70, depois teve seu auge na América do Sul e Europa nos anos 80, e por fim, entre os anos 1990 a 2000 foi prevalente na Ásia e Oriente médio. Nos EUA outros clones de origem nosocomial também se disseminaram e continuam presentes até os dias atuais (Figura 5): como o clone pediátrico (ST5-SCC*mec* IV/ USA800), clone New York/Japão (ST5-SCC*mec* II/ USA100), clone Ibérico (ST8-SCC*mec* IVh/USA500) e EMRSA-16 (ST36-SCC*mec* IV/USA200) (STEFANI et al., 2012; NICHOL et al., 2013). Na América do Sul, os ST5 e ST239 são mais frequentemente encontrados, como o clone Cordobes-Chileno (ST5-SCC*mec* I) presente na Argentina e Colômbia (EGEA et al. 2014), este clone substituiu o clone pediátrico que era prevalente ao final da década de 90 (JIMENEZ et al. 2012). No Brasil, além do clone brasileiro (ST239-SCC*mec* III), os ST30, ST5 e ST1 são prevalentes. Assim como o clone pediátrico, o clone brasileiro parece estar sendo substituído em algumas regiões do Brasil (sul e sudeste) por cepas que carregam o SCC*mec* II e IV (CAIAFFA-FILHO et al., 2013; DUARTE et al., 2018; BRIDE et al., 2019).



**Figura 5:** Distribuição geográfica dos clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina no mundo (em negrito estão destacados os clones mais comuns). Adaptado de MONACO et al. (2016).

Desde o surgimento do primeiro MRSA, no início dos anos 60, até o final da década de 80, as infecções causadas por este patógeno estavam relacionadas à assistência à saúde (NIMMO & COOMBS, 2008). A partir de 1990, começaram a surgir casos de infecções por MRSA em indivíduos saudáveis e sem nenhum tipo de hospitalização anterior, e que mais tarde seriam relatados como os primeiros CA-MRSA. Entre 1997 e 1999 a linhagem CA-MRSA denominada USA400 causou surtos na região centro-oeste dos EUA, logo após, em 2001, esta linhagem foi substituída pelo clone epidêmico USA300. Este clone se estabeleceu como predominante nos EUA causando diversos surtos de infecção de pele e partes moles em indivíduos saudáveis, como atletas e militares, e também acometia recém-nascidos e homossexuais. Além de infecções de pele e partes moles, o USA300 também foi responsável por infecções graves, como sepse e pneumonia necrotizante (NIMMO, 2012). Em 2005 o clone já havia sido relatado em outros continentes, incluindo América do Sul, contudo, não se tornou predominante. Em 2011 foi observado que o USA300 além de estar substituindo outras cepas de *S.*

*aureus*, estava causando infecções mais graves. Nos dias atuais, USA300 ainda é o CA-MRSA mais prevalente nos Estados Unidos e, frequentemente, está associado a surtos em diversos locais pelo mundo (SEIDL et al., 2014; ENSTROM et al., 2018; GUARDABASSI et al., 2019; HANAWA et al., 2020).

Nomeado de USA300-NAE (*North American Epidemic lineage*), este clone é molecularmente caracterizado pela presença de SCC*mec* tipo IVa, *spa type* t008, ST8/CC8, ACME (elemento móvel catabólico da arginina) e PVL. Comumente, carrega genes de virulência e apresenta resistência a poucos antimicrobianos, geralmente, aos beta-lactâmicos e eritromicina. Contudo, nos últimos anos também tem sido observado um aumento na resistência às fluoroquinolonas (JUNIE et al., 2018; GUARDABASSI et al., 2019).

Apesar da disseminação global, o USA300-NAE tem uma baixa prevalência no Brasil, onde clones CA-MRSA pertencentes aos ST5/CC5 e ST30/CC30 ainda são prevalentes (MONACO et al., 2016). Descrito pela primeira vez por Ribeiro et al. (2005), este clone (USA300-NAE) foi relatado poucas vezes ao longo dos anos e, após o primeiro caso, Ribeiro et al. novamente notificaram o isolamento de USA300-NAE em 2007. Em seguida, Schuenck et al. (2009), analisando 20 MRSA, descreveram uma cepa de USA300 isolada de ferida. Posteriormente, Rossi et al., (2014) relataram uma cepa de infecção de corrente sanguínea. Mais recentemente, Zumma et al., (2017) analisaram 61 MRSA obtidos de corrente sanguínea e identificaram duas cepas do USA300. Bride et al. (2019) investigaram 67 cepas, entre elas MSSA e MRSA, e identificaram três de USA300 isoladas de feridas e abscessos. Em contraste, em outros países da América do Sul, como Equador e Colômbia, há a predominância da variante latino-americana (USA300-LV) desde 2006 (REYES et al., 2009; JUNIE et al., 2018; MONACO et al., 2017). Esta variante possui o sistema COMER (elemento móvel de resistência a cobre e mercúrio) no lugar de ACME e abriga o SCC*mec* tipo IVc (PLANET et al., 2015), devido as estas substituições, USA300-LV parece ser menos eficaz na disseminação pelo mundo do que sua variante norte-americana (NIMMO, 2012), no entanto, ambos os clones podem causar infecções invasivas, sendo, inclusive, o USA300-LV já relatado como causador de infecções nosocomiais (JIMENEZ et al., 2012; EGEA et al., 2014).

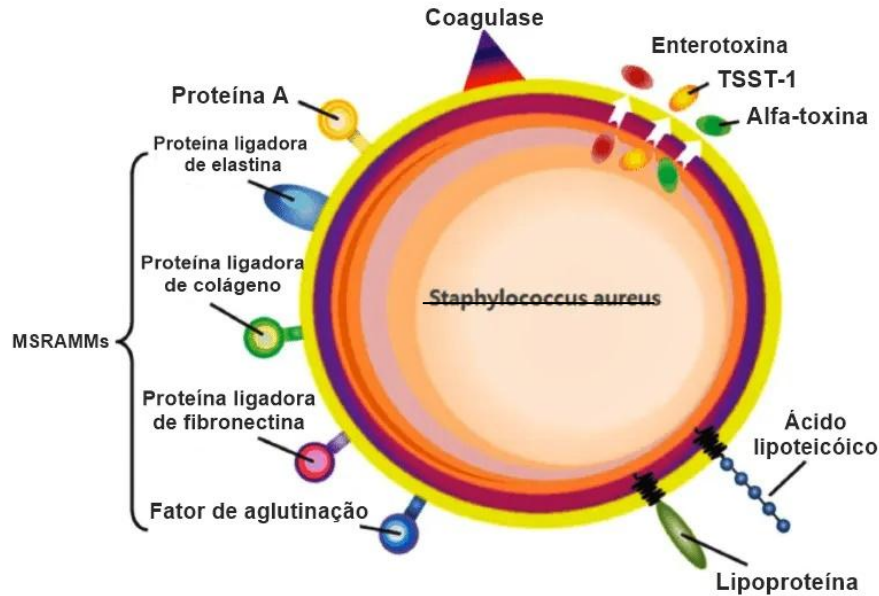
O sucesso de *S. aureus* em causar infecções deve-se ao grande número de fatores de virulência que propiciam a colonização, invasão de tecidos e evasão ao sistema imunológico (FOSTER et al., 2014). Muitas dessas proteínas são secretadas pela bactéria, outras estão presentes em sua superfície, ancoradas covalentemente ao peptidoglicano da parede celular. Conhecidas como proteínas ancoradas à parede celular (CWA), estas proteínas (FnBPA, FnBPB, ClfA, ClfB, Cna, etc) são responsáveis pela adesão, formação de biofilme, aquisição de ferro, invasão celular e evasão da imunidade inata e adaptativa. Algumas dessas proteínas e suas funções estão listadas no Quadro 2 (RASIGADE & VANDENESCH 2014; FOSTER et al., 2014).

**Quadro 2:** Principais proteínas ancoradas à parede celular de *Staphylococcus aureus*.

Proteína	Genes	Função
<b>Fator de aglutinação A</b>	<i>clfa</i>	Adesão ao fibrinogênio imobilizado; evasão imune pela ligação de fibrinogênio solúvel.
<b>Fator de aglutinação B</b>	<i>clfb</i>	Adesão a células epiteliais descamadas; colonização nasal
<b>Proteínas A de ligação à fibronectina</b>	<i>fnbpa</i>	Adesão à matriz extracelular.
<b>Proteínas B de ligação à fibronectina</b>	<i>fnbpb</i>	Adesão à matriz extracelular.
<b>Proteína ligadora de colágeno</b>	<i>cna</i>	Adesão a tecido rico em colágeno; Prevenção da via clássica de ativação do complemento.
<b>Proteína de ligação à sialoproteína óssea</b>	<i>bbp</i>	Adesão à matriz extracelular.
<b>Proteína D contendo repetição de serina-aspartato</b>	<i>sdrd</i>	Colonização nasal.
<b>Proteína E contendo repetição de serina-aspartato</b>	<i>sdre</i>	Evasão imunológica.
<b>Proteína A de superfície regulada por ferro</b>	<i>isda</i>	Captação de heme e aquisição de ferro; adesão a células epiteliais descamadas; resistência para lactoferrina.

Fonte: Adaptado de FOSTER et al, 2014.





**Figura 6:** Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* (estruturais e secretados). Fonte: GORDON & LOWY (2008).

Outro importante fator de virulência de *S. aureus* é a produção de toxinas (Quadro 3). Estas podem ser divididas em três grupos: hemolisinas, leucocidinas e superantígenos. As hemolisinas são divididas de acordo com sua ação lítica, a alfa hemolisina atua formando poros em células nucleadas e eritrócitos, ao passo que a beta hemolisina é uma esfingomielinase dependente de  $Mg^{2+}$  e atua degradando a esfingomielina encontrada na membrana celular de leucócitos, neurônios e eritrócitos (LINA et al., 1999; OTTO, 2015). As leucocidinas, gama hemolisina e leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) formam poros em células do sistema imunológico, como neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (LINA et al., 1999; BRIZUELA et al., 2016). Por fim, os superantígenos incluem enterotoxinas, exfoliatinas A e B e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST). Estes fatores de virulência são essenciais para a sobrevivência de *S. aureus* em seu estado comensal e durante o processo de invasão (RASIGADE & VANDENESCH 2013; FOSTER et al., 2014).

**Quadro 3:** Toxinas secretadas por *Staphylococcus aureus*.

Toxina	Genes	Ação
PVL	<i>lukS, lukF</i>	Toxina formadora de poros
$\alpha$ -Toxina	<i>hla</i>	Toxina formadora de poros
HlgAB (Gama-hemolisina)	<i>hlgA, hlgB</i>	Toxina formadora de poros
HlgCB (Gama-hemolisina)	<i>hlgC, hlgB</i>	Toxina formadora de poros
LukED	<i>lukE, lukD</i>	Toxina formadora de poros
LukAB/HG	<i>lukA/H, lukB/G</i>	Toxina formadora de poros
PSM $\alpha$ 1 - PSM $\alpha$ 4	<i>psm<math>\alpha</math>1 to psm<math>\alpha</math> 4</i>	Modulinas solúveis em fenol
PSM $\beta$ 1, PSM $\beta$ 2	<i>psm<math>\beta</math>1, psm<math>\beta</math>2</i>	Modulinas solúveis em fenol
$\delta$ -Toxina	<i>hld</i>	Modulinas solúveis em fenol
PSM-mec	<i>psm-mec</i>	Modulinas solúveis em fenol
$\epsilon$ -Toxina	<i>cytE</i>	Citotoxina
SEA - SEE, SEG	<i>sea to see, seg</i>	Enterotoxinas, superantígenos de células T
SE-I H to SE-I Y	<i>selh to sely</i>	Superantígenos de células T
TSST-1	<i>tst</i>	Superantígenos de células T
SpA	<i>spa</i>	Superantígeno de célula B
$\beta$ -Toxina	<i>hlb</i>	Esfingomielinase, ligase de biofilme
Toxina exfoliativa A	<i>eta</i>	Serina protease
Toxina exfoliativa B	<i>etb</i>	Serina protease

Fonte: Adaptado de TAM & TORRES, 2018 e OLIVEIRA, BORGES & SIMÕES, 2018.

De todos os fatores de virulência produzidos por *S. aureus*, a PVL tem sido uma das mais investigadas ao longo dos anos. Descrita pela primeira vez em 1930, esta leucocidina bi-componente tem sido apontada como agravante em casos de infecções de pele e tecidos moles em indivíduos saudáveis (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017; TAM & TORRES, 2018). A PVL desempenha diversas funções, tais como: lise de neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos humanos, ativação de canais de cálcio, alterações na transcrição gênica e necrose dependente de concentração (BAKTHAVATCHALAM et al., 2017, OLIVEIRA, BORGES & SIMÕES, 2018). Menos de 5% das cepas de *S. aureus* são capazes de produzir esta citotoxina, porém, os genes *LukS-PV* e *LukF-PV* estão intimamente relacionados ao CA-MRSA chegando a ser considerado um marcador para cepas de origem comunitária (DIEP et al, 2006; BAKTHAVATCHALAM et al., 2017). Juntamente com ACME (elemento móvel catabólico da arginina) e *opp-3* (sistema de permeação de oligopeptídeos) a PVL é considerada peça chave para o sucesso do

clone USA300 em infectar e permanecer no hospedeiro por meio da evasão do sistema imunológico (DIEP et al., 2006).

Além da PVL, ACME e *opp-3*, o clone USA300 possui outros genes associados à expressão de fatores de virulência. Em uma ilha de patogenicidade estafilocócica está contido *SaPI5*, responsável por codificar duas enterotoxinas SEQ e SEK (YARWOOD et al., 2002, TAM & TORRES, 2018). Estas enterotoxinas são superantígenos e promovem a estimulação de células T que expressam elementos específicos do receptor V das células T (DIEP et al 2006, TAM & TORRES, 2018).

Em outro elemento genético está localizado um prófago responsável por codificar a estafiloquinase (SAK) e a fibrolisina (proteína inibidora da quimiotaxia). Esta proteína é um agente anti-inflamatório que inibe o recrutamento de neutrófilos dependente de C5a. A estafiloquinase funciona como ativador do plasminogênio podendo facilitar a disseminação bacteriana promovendo a dissolução de grandes coágulos de fibrina (DIEP et al, 2006, VAKILI et al., 2017).

### **A importância de *Staphylococcus aureus* nas infecções de mama**

O leite materno é o alimento mais completo que existe, sua composição rica em gorduras e minerais traz inúmeros benefícios para o desenvolvimento inicial do recém-nascido. A composição do leite varia de indivíduo para indivíduo e do período pós-parto, no entanto, via de regra, o leite apresenta em sua composição água, carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas, sais minerais, nucleotídeos e imunoglobulinas, tornando-o um alimento ideal para o suprimento das necessidades nutricionais do neonato (CALIL & FALCÃO, 2003). Além de nutrição, o leite materno é responsável pelo início do desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido, provendo anticorpos e imunomoduladores. Por fim, destaca-se que o aleitamento materno promove o contato pele a pele entre mãe e filho, estimulando respostas hormonais, como a produção de prolactina e ocitocina, que podem, indiretamente, melhorar o desenvolvimento cognitivo e psicossocial do neonato (DEL BONO & RABE, 2012).

A amamentação é fortemente recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde nos primeiros seis meses de vida e

incentivada até dois anos ou mais (EIDELMAN, 2012; ASCOM & ANVISA, 2019). Para que o aleitamento seja levado adiante durante esse tempo, deve-se redobrar a atenção aos cuidados com a saúde da mama em razão das diversas enfermidades que as acometem, principalmente no período lactacional.

Afecções de caráter inflamatório são as mais frequentes entre as enfermidades que afetam as mamas e a maior causa de abandono do aleitamento (ESPINOLA-DOCIO et al., 2016). A inflamação da mama é denominada mastite e pode ser dividida em diversas categorias e subcategorias, sendo a classificação dicotômica, lactacional e não lactacional, a mais utilizada. Desencadeada tanto por microrganismos quanto por estímulos hormonais, a mastite é favorecida por fatores que promovam a estagnação do leite, como ingurgitamento, estresse, técnica incorreta de amamentação, uso incorreto de bombas de leite, fissura nos mamilos, higiene precária, entre outros (ESPINOLADOCIO et al., 2016).

A maioria das mastites lactacionais evolui para um quadro de abscesso mamário, principalmente quando a lactante tem a primeira gravidez após os 30 anos de idade ou teve gestação com mais de 41 semanas. Pacientes diabéticos, obesos e fumantes tendem a desenvolver infecções recorrentes (DENER & INAN 2003; KATARIA, SRIVASTAVA & DHAR, 2013). O desenvolvimento de abscesso mamário é relativamente comum em lactantes que tiveram mastite (DENER & INAN 2003). O tratamento do abscesso envolve incisão e drenagem do pus, juntamente com uso de antimicrobianos, contudo, a eficácia do tratamento é dificultada pela resistência da lactante a aderir ao tratamento por receio de comprometer a saúde do recém-nascido (KATARIA, SRIVASTAVA & DHAR, 2013; ESPINOLA-DOCIO et al., 2016).

Por ser rico em nutrientes, o leite materno torna-se um meio de cultura ideal para o crescimento de microrganismos. Na maioria dos casos, *S. aureus* é o agente etiológico mais comumente encontrado nas infecções, com uma prevalência de 40 a 50%, seguido de *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* do grupo B, enterobactérias, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas* spp. (CONTRERAS & RODRÍGUEZ, 2011; KATARIA, SRIVASTAVA & DHAR, 2013; BOUTET, 2012; ESPINOLA-DOCIO et al., 2016). Normalmente, a infecção por *S. aureus* ocorre através de fissura mamilar, porém, pode ocorrer infecção hematogênica. A infecção tende a ficar somente em único segmento da mama, contudo, sob circunstâncias

que impeçam a saída do leite, a infecção pode se espalhar pelos ductos lácteos e estroma, acometendo toda a mama (KATARIA, SRIVASTAVA & DHAR, 2013).

A prevalência de *S. aureus* em infecções de mama varia geograficamente. Em estudo realizado por RAMAKRISHNAN et al. (2019), analisando 97 casos de abscessos de mama na Índia, foi identificada a presença de *S. aureus* em 58% das infecções. Na Itália, RIMOLDI et al. (2019) analisaram 60 isolados obtidos de mastite e abscesso de mama. Neste estudo, *S. aureus* foi o causador de 78,3% dessas infecções sendo 44,6% MRSA. Na Irlanda, 108 isolados foram analisados por RUSSELL et al. (2019) que observaram uma taxa de 40,7% de *S. aureus* nas infecções, sendo que 5,88% eram MRSA. Além de estudos conduzidos com isolados obtidos diretamente do sítio de infecção, análises da microbiota do leite também demonstram a prevalência de *S. aureus* durante a infecção. JIMÉNEZ et al. (2015) compararam o microbioma do leite saudável com o do leite mastítico e observaram os gêneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Elizabethkingia*, *Variovorax*, *Bifidobacterium*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterobacter* em mulheres saudáveis ao passo que no leite de mulheres acometidas por mastite aguda e subaguda foram, predominantemente, encontradas as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente. O estudo conduzido por PATEL et al. (2017) também verificou a microbiota do leite humano de mulheres saudáveis e acometidas por mastite. Nas amostras de mulheres saudáveis foram identificados os gêneros *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Ralstonia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterococcus* e *Pseudomonas* ao passo que nas amostras de mastite aguda e subaguda a microbiota foi bastante distinta e drasticamente reduzida, reforçando a hipótese de que mulheres acometidas por mastite têm menor diversidade microbiana e maior abundância de patógenos oportunistas.

Em grávidas, a maior parte das infecções por MRSA são de pele e partes moles, como a mastite infecciosa e os abscessos mamários, estando também relacionado a casos de pneumonia puerperal, meningite e sepse (CORREA et al., 2012; CULLINANE et al., 2015; TOGO et al., 2019). O tratamento para mastite/abscesso lactacional é realizado utilizando antimicrobianos e anti-inflamatórios orais não tóxicos, evitando que os mesmos sejam excretados no leite. Os esquemas de antibióticos mais recomendados para o tratamento de infecções na

mama incluem amoxicilina + clavulanato 875 mg (duas vezes ao dia) ou cefalexina 500 mg (quatro vezes ao dia). Alternativamente, quando a paciente possui alergia à penicilina ou a bactéria é resistente a mesma, outros esquemas são utilizados como: ciprofloxacina 500 mg (duas vezes ao dia), clindamicina 300 mg (quatro vezes ao dia), dicloxacilina 500 mg (quatro vezes ao dia) e o sulfametoxazol/trimetoprima 160/800 mg (duas vezes ao dia) (VALENTE & GROBMYER, 2018). Em casos mais graves, onde os antimicrobianos de primeira e segunda escolha não possam ser utilizados o tratamento fica limitado ao uso de antimicrobianos como vancomicina, tigeciclina, linezolida e daptomicina que apresentam custos e toxicidade elevados ou possuem uso vetado para lactantes (GOULD et al., 2011; RAHIMI, 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo verificar a prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em infecções de mama de pacientes atendidas no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) bem como pesquisar genes relacionados à virulência e caracterizar geneticamente estes isolados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- i. Determinar a prevalência de MRSA em infecções de mama;
- ii. Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos normalmente utilizados na prática clínica;
- iii. Identificar o tipo de cassete cromossômico *mec* estafilocócico (SCC*mec*);
- iv. Investigar a ocorrência de genes relacionados à adesão, invasão e lise celular;
- v. Realizar a tipagem do gene que codifica a proteína A;
- vi. Determinar a similaridade genética entre os isolados;
- vii. Identificar os STs circulantes e compará-los com as linhagens circulantes em outras regiões.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO, LOCAL DO ESTUDO E AMOSTRAS BACTERIANAS

Este é um estudo de caráter transversal onde foram utilizadas 43 amostras de MRSA isoladas de infecções mamárias coletadas entre o período de abril de 2017 a maio de 2019 de pacientes atendidas no Setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM).

O HUCAM é um hospital-escola referência em média e alta complexidades, incorporado à Universidade Federal do Espírito Santo, localizado na capital do estado, Vitória. Direciona seus esforços para assistência, ensino, pesquisa e extensão na área da saúde, atendendo pacientes de todo o Espírito Santo e estados adjacentes. O hospital possui 300 leitos ativos e 129 consultórios (36 leitos dedicados à unidade de saúde da mulher e maternidade infantil). Por ano, são realizadas mais de 200 mil consultas (aproximadamente, 16 mil consultas e 1.200 procedimentos cirúrgicos por mês). Além disso, durante o ano são realizados cerca de 500 mil exames de análises clínicas, 14 mil cirurgias, 10 mil internações, 1.500 partos e 25 mil exames por imagem. O HUCAM também se destaca como centro de referência para diagnóstico e tratamento de AIDS, tuberculose multirresistente, maternidade de alto risco, terapia intensiva neonatal e de adulto, transplante renal, cirurgia geral e cardíaca, hemodinâmica e outros atendimentos de maior complexidade.

As amostras bacterianas deste estudo foram isoladas, primariamente, pelo Laboratório de Microbiologia do HUCAM. Seguindo os critérios de inclusão, todas as pacientes que apresentaram sinais de infecção nas mamas (destacadamente: dor, inchaço, febre, enrijecimento, ponto de flutuação e descamação) tiveram material coletado (punção ou drenagem) para análise microbiológica. A identificação das amostras foi realizada utilizando o sistema automatizado *VITEK 2 Compact* (BioMérieux, France). As amostras identificadas como MRSA pelo Laboratório do HUCAMM foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana, localizado no Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo e estocadas em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth* - Kasvi, Brasil) acrescido de 20% de glicerol e mantidas a -20°C.



#### 4.1.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Este estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCAM, estando registrado sob o CAAE 16343119.5.0000.5060.

#### 4.2 COLETA DE DADOS

Foram coletadas informações sociodemográficas e relacionadas ao histórico de saúde das pacientes por meio de consulta aos respectivos prontuários médicos. As informações coletadas estão descritas no quadro a seguir:

**Quadro 4: Informações coletadas dos prontuários médicos das pacientes do estudo.**

Paciente:
Idade:
Bairro/Município:
Estado civil:
Escolaridade:
Lactante? ( ) Sim ( ) Não
Tipo de parto:
Atendimento: ( ) Ambulatório ( ) Internada
Presença de doença de base ( ) Não ( ) Sim. Qual?
Uso de antibióticos nos últimos 30 dias ? : ( ) Não ( ) Sim. Qual?
Há relatos de:
( ) Estase do leite
( ) Fissuras mamilares
( ) Ingurgitamento
( ) Mastite e/ou abscesso anterior
( ) Uso de bomba de sucção de leite

#### 4.3 CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

A confirmação molecular da identificação das amostras deu-se por meio da realização do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene *nuc*, específico da espécie *S. aureus*, conforme descrito a seguir.

#### 4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

Em uma placa de ágar sangue, foi realizada uma semeadura em “tapete”, de modo a cobrir toda a placa com o crescimento bacteriano. Em um microtubo contendo 400 µL de solução de lise (0,5 mL de 5000 unidades/mL de lisozima [Sigma-Aldrich, EUA]; 0,5 mL 500 unidades/mL de lisostafina [Sigma-Aldrich]; 0,2 mL de EDTA 0,5 M; 0,1 mL Tris 1M; 8,7 mL de água deionizada) foi adicionado 1/8 do crescimento da placa e incubado a 37°C por 30 minutos. Após o pré-tratamento com a solução de lise, utilizou-se o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Pomega, USA) para a liberação e purificação do DNA, seguindo os procedimentos determinados pelo fabricante. A armazenagem do DNA obtido foi feita a -2°C.

#### 4.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DO GENE

*nuc*

Foi realizado segundo o protocolo estabelecido por Brakstad, Aasbakk & Maeland (1992), com modificações. A amplificação foi realizada através de um termociclador (Veriti – Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) utilizando um volume total de 50 µL para uma reação composta de: 1µL de DNA, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 5 µL do tampão da enzima 10x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich) e acrescido de 0,4 µM dos oligonucleotídeos *nuc1* (5’GCGATTGATGGTGATACGGTT3’) e *nuc2* (5’AGCCAAGCCTTGACGAAC TAAAGC 3’). A amplificação seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 30 segundos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. Subsequentemente, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE (0,89 M Tris [Hexapur], 0,89 M ácido bórico [Hexapur], 2,5 mM EDTA [Hexapur], pH 8,2), a 100V por 1h:30min. A coloração do gel foi realizada utilizando solução de brometo de etídio a 0,5µg/mL (Hexapur, Amsterdam-Holanda) por 10 minutos e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, UNISCIENCE, Brasil). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o padrão de 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen,

EUA). As amostras que apresentaram uma banda equivalente a 270pb foram confirmadas como *S. aureus*.

#### 4.4 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Uma parte dos testes foi realizada utilizando o sistema de identificação automatizada *VITEK 2 Compact* (BioMérieux, França). Os antimicrobianos testados por este método foram: gentamicina, rifampicina, clindamicina, ciprofloxacina, eritromicina, levofloxacina, linezolida, teicoplanina, sulfametoxazol/trimetoprima e vancomicina. A interpretação dos resultados foi feita segundo o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast,2019).

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos antimicrobianos oxacilina e vancomicina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme preconizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) 2018.

Os antimicrobianos foram ressuspensos em água e diluídos 1:1 em caldo Mueller Hinton cátion ajustado (Sigma-Aldrich). Após a resuspensão dos antimicrobianos, os mesmos foram diluídos de forma seriada até obter as concentrações de 256 a 2µg/mL. A partir de uma semente recente (18-24h), uma a duas colônias foram ressuspensas em solução salina a fim de obter o padrão de turvação de 0,5 da escala McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente, esta solução foi diluída 1:20 a fim de obter  $\sim 1,5 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, foram adicionados 180µL da diluição dos antimicrobianos e 20µL da ressuspensão bacteriana a  $\sim 1,5 \times 10^6$  UFC/mL. Após este procedimento, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 18-24h. Após o período de incubação, foi realizada a leitura visual dos poços, onde os poços que apresentaram turvação foram considerados positivos para crescimento microbiano. A concentração do primeiro poço onde não houve turvação do meio foi considerada a concentração mínima inibitória da bactéria. O controle positivo utilizado para o teste foi o *S. aureus* ATCC 25923 e a interpretação foi realizada segundo os pontos de corte estabelecidos pelo BRcast (2019).

A CMI de daptomicina foi realizada através de E-test® (BioMerieux). A partir de uma semente recente (18-24h), foram selecionadas de 3 a 5 colônias para serem

diluídas em solução salina 0,9% (p/v), até atingir o padrão de turvação de 0,5 da escala de McFarland. Visando obter um crescimento homogêneo em toda placa contendo ágar Müller-Hinton (Difco), foi utilizado um *swab* para espalhar a ressuspensão bacteriana e realizar a semeadura em forma de “tapete”. Em seguida, as fitas de E-test foram, delicadamente, colocadas sobre o meio de cultura. Após incubação de 18-24 horas a 35 °C foi realizada a leitura do teste. A interpretação do teste deu-se a partir da leitura do halo de inibição criado pela fita graduada impregnada de antimicrobiano. Considerou-se o ponto graduado onde iniciou o crescimento microbiano. A leitura ocorreu segundo os parâmetros estabelecidos pelo BRcast (2019). Para controle de qualidade do teste foi utilizada a amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923.

#### **4.5 TIPAGEM DO CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*)**

A identificação do tipo de SCC*mec* das amostras foi realizada de acordo com o protocolo utilizado por Milheiriço, Oliveira & De Lancastre (2007).

A PCR-multiplex foi realizada utilizando 20 oligonucleotídeos específicos e descritos na Tabela 1. Como controles internos da reação foram utilizados os oligonucleotídeos *mecA* P4 e *mecA* P7, responsáveis pela amplificação do gene de resistência *mecA*.

O volume de reação foi de 50 µL, sendo constituído por: 1 µL de DNA, 5 µL do tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada deoxinucleotídeotri-fosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Estados Unidos); 2,0 U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich); 0,4 µM dos oligonucleotídeos: CIF2 R2 e F2, RIF2 F10 e F13, SCC*mec* VJI F e R, SCC*mec* V - VJI F e VJ1 R, SCC*mec* III- J1 F e J1 R; 0,4 µM dos oligonucleotídeos *ccrC* F2 e *ccr* R2, *dcs* F2 e R2, *ccrB2* F2 e R2, *mecl* P2 e P3, *mecA* P4 e P7; e 0,2 µM dos oligonucleotídeos KDF1 e R1 (Invitrogen).

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems) obedecendo as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C mais 30 segundos de anelamento a 53°C e também um minuto de extensão a 72 °C,

sendo finalizado com 4 minutos de extensão a 72 °C. Após a amplificação, o produto da PCR foi analisado em eletroforese de gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Decorrido o período de 2h de corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda) e sua imagem capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen).

**Tabela 1:** Identificação, sequência nucleotídica, especificidade dos oligonucleotídeos e tamanhos dos amplicons da reação de PCR-multiplex para tipagem do cassete cromossômico *mec* das amostras deste estudo.

Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica (5'-3')	SCC <i>mec</i> /Região	Amplicons (pb)
cif2 F2	TTCGAGTTGCTGGATGAAGAAGG	I, região J1	495
cif2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
dcs F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	I, II, IV e VI, região J3	342
dcs R1	CTAATCATAGCCATGACCG		
kdp F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	II, região J1	284
kdp R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
mecl P2	ATCAAGACTTGCATTACAGGC	II e III, complexo <i>mec</i>	209
mecl P3	GCGGTTTTCAATTCATTGTC		
ccrB2 F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	II e IV, complexo <i>ccr</i>	311
ccrB2 R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
SCC <i>mec</i> III J1 F	CATTTGTGAAACACAGTACG	III, região J1	243
SCC <i>mec</i> III J1 R	GTTATTGAGACTCCTAAAGC		
rif5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	III, região J3	414
rif5 R13	GTCACAGTAATTCATCAATGC		
ccrC F2	GTAATGGCTTACAATGTTTGG	V, complexo <i>ccr</i>	449
ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		
SCC <i>mec</i> V J1 F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	V, região J1	377
SCC <i>mec</i> V J1 R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
mecA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	Controle interno positivo	162
mecA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

#### 4.6 SUBTIPAGEM DO SCC*mec* IV

O teste ocorreu seguindo o protocolo estabelecido por Milheiriço, Oliveira & De Lancastre (2007b). A reação de PCR-multiplex foi realizada utilizando 14 oligonucleotídeos específicos e descritos na Tabela 2. Como controle interno da reação foram utilizados os *primers ccrB-F* e *ccrB-R*, responsáveis pela amplificação do complexo *ccr* do elemento genético.

O volume de reação foi de 50 µL, sendo constituído por: 1 µL de DNA, 5 µL do tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 50 µM de cada deoxinucleotídeotri-fosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Estados Unidos); 1,25 U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich); 0,4 µM dos oligonucleotídeos: *J IVa F*, *J IVa R*, *J IVb F* e *J IVb R*; 0,8 µM pmoles dos oligonucleotídeos *ccrB2 F*, *J IVc F* e *J IVc R*; 1,6 µM pmoles dos oligonucleotídeos *ccrB2 R*, *J IVd F* and *J IVd R*; 90 pmoles dos oligonucleotídeos *IVg F* e *J IVg R* e 180 pmoles dos oligonucleotídeos *J IVh F* and *J IVh R*.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems) obedecendo as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, acompanhada por 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C mais 30 segundos de anelamento a 48°C e dois minutos de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 4 minutos de extensão a 72 °C.

Após a amplificação, o produto da PCR foi analisado em eletroforese de gel de agarose a 2,0% em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Após o período de 1h:30min de corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) e sua imagem capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen).

**Tabela 2:** Amplicons gerados e oligonucleotídeos utilizados para subtipagem do SCCmec IV.

Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica (5'-3')	Especificidade	Amplicons (pb)
<i>ccrB2 F</i>	CGAACGTAATAACATTGTCG	<i>ccrB2</i> (Controle interno)	203
<i>ccrB2 R</i>	TTGGCWATTTTACGATAGCC		
<i>J IVa F</i>	ATAAGAGATCGAACAGAAGC	Tipo IVa	278
<i>J IVa R</i>	TGAAGAAATCATGCCTATCG		
<i>J IVb F</i>	TTGCTCATTTTCAGTCTTACC	Tipo IVb e IVF	336
<i>J IVb R</i>	TACTTCAGCTGCATTAAGC		
<i>J IVc F</i>	CCATTGCAAATTTCTCTTCC	Tipo IVc e IVE	483
<i>J IVc R</i>	ATAGATTCTACTGCAAGTCC		
<i>J IVd F</i>	TCTCGACTGTTTGCAATAGG	Tipo IVd	575
<i>J IVd R</i>	CAATCATCTAGTTGGATACG		
<i>J IVg F</i>	TGATAGTCAAAGTATGGTGG	Tipo IVg	792
<i>J IVg R</i>	GAATAATGCAAAGTGGAAACG		
<i>J IVh F</i>	TTCCTCGTTTTTTCTGAACG	Tipo IVh	663
<i>J IVh R</i>	CAAACACTGATATTGTGTCG		

#### 4.7 DETECÇÃO DOS GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA BACTERIANA

A detecção dos genes *lukS/F-PV*, *hla*, *hly*, *hld*, *hlg* e *hlg-2* ocorreu por meio de PCR-multiplex, segundo o protocolo estabelecido por JARRAUD et al. (2002). Os amplicons gerados e os oligonucleotídeos utilizados para a realização dos testes estão descritos na Tabela 3. O volume total de reação foi de 25 µL, onde estavam contidos: 1,0 µL de DNA, 2,5µL de Tampão da enzima Taq (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxinucleotídeotrifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen), 0,5 U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich) e 0,8µM dos seus respectivos oligonucleotídeos. A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C mais 1 minuto de anelamento a 55° C e 2 minutos de extensão a 72°C, sendo finalizado com 10 minutos de extensão a 72 °C.

A detecção dos genes *fnbB*, *clfA* e *clfB* ocorreu por PCR multiplex, segundo o protocolo estabelecido por TRISTAN et al. (2003). O volume da reação foi de 25 µL contendo: 1,0 µL de DNA, 2,5 µL de tampão da enzima Taq (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada deoxinucleotídeotrifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen); 1,5 U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich); 0,8 µM dos respectivos oligonucleotídeos. A amplificação dos fragmentos foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, acompanhada por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C mais 1 minuto de anelamento a 55 °C e também um minuto de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 10 minutos de extensão a 72°C.

O gene *cna* foi detectado por PCR simples, segundo o protocolo estabelecido por TANG et al. (2013). O volume total da reação foi de 25µL contendo: 1,0 µL de DNA, 2,5 µL de Tampão da enzima Taq (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada deoxinucleotídeotrifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen); 1U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich) e 0,4 µM dos oligonucleotídeos. A amplificação dos fragmentos foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, acompanhada por 35 ciclos de 40 segundos de desnaturação a 95 °C mais 50 segundos de anelamento a 54 °C e

50 segundos de extensão a 72 °C, sendo finalizado com 10 minutos de extensão a 72°C.

Posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação dos fragmentos. A eletroforese ocorreu em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Depois de 1h:30min de corrida eletroforética a 100 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) e sua imagem capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen).

**Tabela 3:** Sequências nucleotídicas e amplicons dos genes relacionados à virulência investigados neste estudo.

Oligonucleotídeos	Gene	Sequência nucleotídica (5'-3')	Amplicons (pb)	Referência
PVL-1	<i>lukS/F-PV<sup>1</sup></i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	JARRAUD et al. (2002)
PVL-2		GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		
HLA-1	<i>hla<sup>1</sup></i>	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	JARRAUD et al. (2002)
HLA-2		CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
HLB-1	<i>hlb<sup>1</sup></i>	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309	JARRAUD et al. (2002)
HLB-2		GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
HLD-1	<i>hld<sup>1</sup></i>	AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	111	JARRAUD et al. (2002)
HLD-2		TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA		
mpHLG-1	<i>hlg<sup>1</sup></i>	GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535	JARRAUD et al. (2002)
mpHLG-2		CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG		
mpHLG2-1	<i>hlg-2<sup>1</sup></i>	GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	390	JARRAUD et al. (2002)
mpHLG2-2		ATAGTCATTAGGATTAGTTTCACAAAG		
FNBB1	<i>fnbB<sup>2</sup></i>	GTAACAGCTAATGGTCTGAATTGATACT	524	TRISTAN et al. (2003)
FNBB2		CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
cna1	<i>cna</i>	CGATAACATCTGGGAATAAA	716	TANG et al. (2013)
cna2		ATAGTCTCCACTAGGCAACG		
clfA1	<i>clfA<sup>2</sup></i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	TRISTAN et al. (2003)
clfA2		CGTTTCTTCGGTAGTTGCATTTG		
clfB1	<i>clfB<sup>2</sup></i>	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205	TRISTAN et al. (2003)
clfB2		TTCGCACTGTTTGTGTTTGAC		

<sup>1</sup>Multiplex I    <sup>2</sup> Multiplex II



#### **4.8 ANÁLISE DO PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DAS AMOSTRAS COM USO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Sma*I E SEPARAÇÃO EM GEL POR ELETROFERESE DE CAMPO PULSADO (PFGE).**

Este teste foi realizado conforme o protocolo estabelecido por VIVONI et al. (2005).

Inicialmente, as amostras de *S. aureus* foram semeadas em ágar sangue e incubadas a 37 °C por 24 - 48 horas. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em solução salina a 0,9% (p/v) até atingirem um padrão de turvação de 3,0 da escala McFarland, correspondendo, aproximadamente, a  $9 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida, 1,5 mL da ressuspensão foram centrifugados em microtubo durante 5 minutos a 4.000 xg. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células bacterianas foram ressuspensas em 250 µL de solução PIV (NaCl 1M, TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6). Em seguida, adicionou-se a ressuspensão 250 µL de agarose de baixo ponto de fusão (“low melting point agarose”, Promega, EUA) a 2% dissolvida em solução PIV. A solução contendo agarose foi distribuída em moldes retangulares e, posteriormente, armazenada a 4 °C por 10 minutos para enrijecimento e formação dos “plugs”. Subsequentemente, os “plugs” foram incubados a 37° C em uma solução de lise EC (Tris-HCl 6mM, NaCl 1M, EDTA 100 mM, 0,5 Brij 58 e 0,5% laurilsarcosinato de sódio, pH final 7,5) acrescida de 50.000 U de lisozima (Sigma-Aldrich) e 50 U de lisostafina (Sigma-Aldrich). Após 18 horas, a solução foi substituída por 2 mL de solução ESP (EDTA 0,4M pH 9,5, 1% (p/v) de laurilsarcosinato de sódio) contendo 0,1mg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich) e foi novamente incubada, desta vez a 50° C por 18 horas. Decorrido o tempo, a solução anterior foi removida e substituída por 2 mL de uma nova solução ESP e subsequente armazenamento a 4° C. A digestão do DNA cromossômico iniciou-se com a lavagem dos “plugs” (quatro lavagens realizadas com tampão TE 1X (Tris 10 mm, EDTA 1 mM), cada lavagem com duração de 1h, seguidas de incubação a 37°C. Na última lavagem os “plugs” permaneceram incubados por 18 horas. Decorrido o tempo, o tampão foi removido e adicionou-se aos “plugs” uma solução contendo 250 µL do tampão da enzima *Sma*I (Thermo Scientific, EUA) e foi incubado a 25°C durante 4 horas. Após este período, a solução foi drenada e adicionou-se um novo tampão da enzima acrescido de 20 U da enzima de restrição *Sma*I seguido de incubação a 25° C por 18 horas. Posteriormente, o tampão contendo a enzima *Sma*I

foi removido e os “plugs” foram aplicados em poços de gel de agarose a 1% (Hygradene, EUA) e submersos em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2) a 14° C. A eletroforese ocorreu em equipamento de eletroforese de campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos, durante 21 horas, a 6 V/cm, em angulação de 120°. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) por 30 minutos e descorado por 20 minutos com água destilada, em seguida, sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o marcador 50-1.000 kb *Lambda Ladder PFGE Marker* (New England Biolabs). O padrão de fragmentação das amostras foi verificado utilizando o software Gel J. Amostras com similaridade acima de 80% foram consideradas do mesmo pulsotipo e com perfil de bandas idêntico foram consideradas do mesmo subtipo. Além disso, os padrões de fragmentação foram comparados com os descritos por MCDUGAL et al. (2003).

#### 4.9 TIPAGEM DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA A (*spa typing*)

A amplificação da região X do gene da proteína A de *S. aureus* foi realizada segundo o protocolo estabelecido por Harmsen et al. (2003).

O volume final da reação foi de 50µL, contendo: 1,25U de Taq DNA polimerase (JumpStar, Sigma-Aldrich), 5 µL do tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 3) e 1µL de DNA. A amplificação dos fragmentos realizou-se em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems) obedecendo as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos, finalizando com extensão a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados e amplicons gerados na tipagem do gene da proteína A de *Staphylococcus aureus*.

Nome	Sequência nucleotídica (5'-3')	Amplicons (pb)
spa1f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	200 a 600
spa2r	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5 % e corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur) e sua imagem capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen).

Após confirmação da presença de uma banda única, o produto foi purificado diretamente do amplificado utilizando o *kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System kit* (Promega, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, a amostra foi sequenciada em aparelho *AB 3500 Series Genetic Analyzers Platform* (Applied Biosystems, USA) utilizando o método de Sanger. A análise das sequências foi realizada utilizando o servidor *spa typer* (<http://spatyper.fortinbras.us/>).

#### **4.10 MULTIOCCUS SEQUENCE TYPING (MLST)**

Três cepas, selecionadas de acordo com os resultados encontrados pela técnica de PFGE descrita no item 4.8, foram submetidas à técnica de MLST. Para a amplificação dos sete genes constitutivos *arcC* (quinase de carbamato), *aroE* (desidrogenase chiquimato), *glpF* (glicerol cinase), *gmK* (guanilato-quinase), *pta* (fosfato aciltransferase), *tpi* (triosefosfato) e *yqiL* (acetil CoAacetiltransferase) foram utilizadas as sequências descritas na Tabela 5, obtidas a partir do protocolo estabelecido por ENRIGHT et al. (2000). O alinhamento e edição das sequências foram realizados utilizando o programa *seaview4* e *Bioedit 7.2*, respectivamente. Em seguida, as sequências foram consultadas no banco de dados do MLST (<http://saureus.mlst.net/>). Cada um dos genes possui diversos alelos que recebem numerações distintas à medida que variações em sua sequência são identificadas. A combinação dos sete alelos fornece a identidade de um *sequence type* (ST) e a qual complexo clonal (CC) ele pertence.

**Tabela 5:** Descrição dos oligonucleotídeos utilizados e amplicons gerados na realização do *multilocus sequence type*.

Nome	Sequência (5'-3')	Amplicons (pb)	Gene/Produto
arc up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	570	<i>arcC</i> - Carbamato quinase
arcdn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG		
aro up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	536	<i>aroE</i> - Shikimato desidrogenase
aro dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC		
glp up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	543	<i>glpF</i> - Glicerol quinase
glp dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC		
gmk up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	488	<i>gmk</i> - Guanilato quinase
gmk dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA		
pta up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	575	<i>pta</i> - Fosfato acetil transferase
pta dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA		
tpi up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	475	<i>tpi</i> – Triosefosfato isomerase
tpi dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
yqi up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	598	<i>yqiL</i> - Acetil coezima A acetiltransferase
yqi dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC		

## 5. RESULTADOS

### ISOLAMENTO BACTERIANO DAS INFECÇÕES MAMÁRIAS

Durante a condução deste estudo, 75 pacientes foram atendidas no HUCAM apresentando sinais de infecção nas mamas e tiveram material coletado para cultura. Foram isolados 79 microrganismos, sendo três (3,8%) infecções polimicrobianas. *S. aureus* foi o agente prevalente, sendo isolado em 73,4% (n = 58) dos casos e, destes, 79,3% (n = 46) eram MRSA. Os outros microrganismos identificados foram: *Staphylococcus epidermidis* (6), *Klebsiella pneumoniae* (3), *Staphylococcus hominis* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Serratia marcescens* (1), *Sphingomonas paucimobilis* (1), *Streptococcus anginosus* (1), *Corynebacterium pseudodiphthericum* (1), *Streptococcus pyogenes* (1), *Enterobacter cloacae* (1) *Escherichia coli* (1) e *Enterococcus faecalis* (1).

Dos 46 MRSA isolados, 43 foram incluídos neste estudo. Três pacientes que apresentaram infecções por este agente estavam com os prontuários incompletos e suas respectivas amostras foram excluídas do estudo.

Destes 43 MRSA isolados de infecções mamárias, 26 (60,5%) foram de abscessos e 17 (39,5%) de mastite.

### DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A faixa etária das pacientes variou de 18 a 49 anos, sendo a média de idade de 27 (DP±8.2) anos. A maioria das pacientes residia na cidade de Vitória (16). As outras foram oriundas de: Serra (07), Cariacica (07), Vila Velha (6) e Viana (2) Aracruz (2), Sooretama (1), Alfredo Chaves (1) e Guarapari (1). Quanto ao estado civil, 27 pacientes afirmaram serem solteiras e 16 casadas.

A escolaridade das pacientes variou entre o 1º grau incompleto ao superior, sendo a seguinte distribuição: 1º grau incompleto (2 - 4,6%), 1º grau completo (4 - 9,6%), 2º grau incompleto (2 - 4,6%), 2º grau completo (20 - 46,5%), superior incompleto (3 - 6,9%), superior (6 - 13,9%) e sem instrução/ignorado (6 - 13,9%).

Apenas três pacientes não estavam em período de lactação quando apresentaram a infecção. O período entre início da amamentação e o aparecimento de sintomas relacionados à mastite ou abscessos variou entre sete dias e 16 meses após o parto. Quanto às três pacientes não lactantes, os casos foram relacionados ao uso de implantes mamários, à infecção do sítio cirúrgico após remoção de câncer de mama e a problemas relacionados à colocação de *piercing* no mamilo.

Das pacientes lactantes, mais da metade (24) foi submetida a parto cesáreo e nove realizaram parto normal. As sete pacientes restantes não tiveram seu tipo de parto discriminado no prontuário. Com exceção de apenas três pacientes, todos os outros partos ocorreram em outros hospitais, ou seja, não foram realizados no HUCAM.

Majoritariamente, os atendimentos às pacientes foram realizados como consulta no setor de Ginecologia e Obstetrícia (GO) do HUCAM. Além das consultas feitas na GO (33), também foram realizados atendimentos no ambulatório (4), na maternidade (3) e em outros setores não informados no prontuário (3). As pacientes que necessitaram realizar a drenagem do abscesso foram internadas para procedimento cirúrgico. O tempo de internação variou conforme a extensão dos procedimentos realizados. Tempos de internação acima de dois dias foram relacionados ao uso de dreno nas mamas (23/43) e administração de antimicrobiano por via endovenosa.

A maioria das pacientes avaliadas (30) não apresentou nenhum tipo de comorbidade (Tabela 6). Dentre as enfermidades que acometiam as demais pacientes estavam: hipertensão (7), diabetes (3) hipotireoidismo (2), asma (2) e obesidade (2).

Do total de pacientes, 36 fizeram uso prévio de algum antimicrobiano. Destacadamente, cefalexina foi o mais prescrito (28 vezes, isolado ou em associação com outro antimicrobiano). Além da cefalexina, os antimicrobianos mais prescritos foram cefazolina (seis vezes), oxacilina (três vezes) e cefalotina (três vezes).

Queixas comuns das pacientes foram: dor, endurecimento da mama, dificuldade na saída do leite, inchaço, vermelhidão e febre. Os relatos dos profissionais médicos quanto ao estado das mamas foram: hiperemia, eritema, dor a

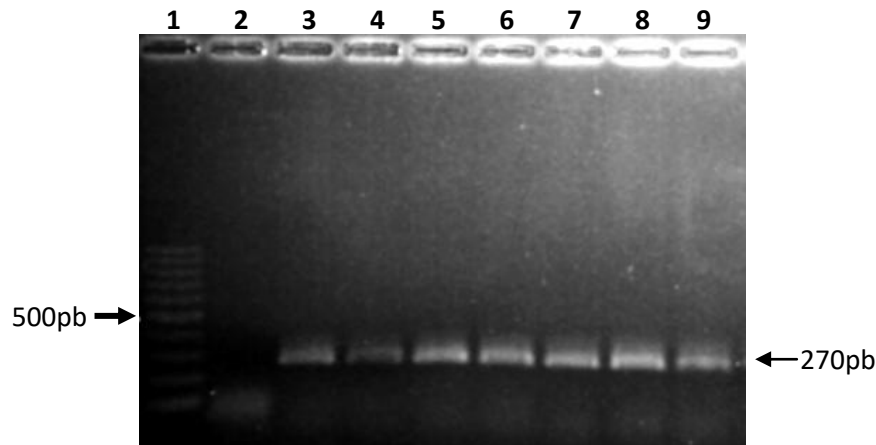
palpação, febre, mamas rígidas, fissuras mamilares, ingurgitamento, ductos dilatados e sinais de flutuação. A Tabela 6 apresenta as características demográficas das pacientes envolvidas no presente estudo.

**Tabela 6:** Dados demográficos coletados das 43 pacientes deste estudo.

<b>STATUS CIVIL</b>	<b>N° (%)</b>
Solteira	27 (62,7)
Casada	16 (37,3)
<b>ESCOLARIDADE</b>	
GRUPO I Ensino médio ou superior	31 (72)
GRUPO II Sem instrução ou ensino básico	12 (28)
<b>LACTANTE</b>	
Sim	40 (93)
Não	03 (7)
<b>USO PRÉVIO DE ANTIMICROBIANOS (até 30 dias anteriores à consulta)</b>	
Cefalexina	28
Cefazolina	06
Amoxicilina + clavulanato	04
Ceftriaxona	03
Cefalotina	02
Clindamicina	02
Oxacilina	02
Penicilina	01
Sulfametoxazol/trimetoprima	01
<b>COMORBIDADES</b>	
Nenhuma	30 (69,7)
Hipertensão	05 (11,6)
Diabetes	02 (4,6)
Hipotireoidismo	01 (2,3)
Asma	01 (2,3)
Obesidade	01 (2,3)
Hipotireoidismo e obesidade	01 (2,3)
Asma e hipertensão	01 (2,3)
Diabetes e hipertensão	01 (2,3)

## CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE ATRAVÉS DA DETECÇÃO DO GENE *nuc*.

O fragmento correspondente ao gene *nuc*, específico da espécie *S. aureus*, foi detectado em todas as 43 amostras (Figura 7).



**Figura 7:** Foto ilustrativa da eletroforese para detecção do gene *nuc*. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de 100pb. Linha 2: Controle negativo (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984). Linha 3: Controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923). Linhas 4 a 9: amostras de *S. aureus* do estudo.

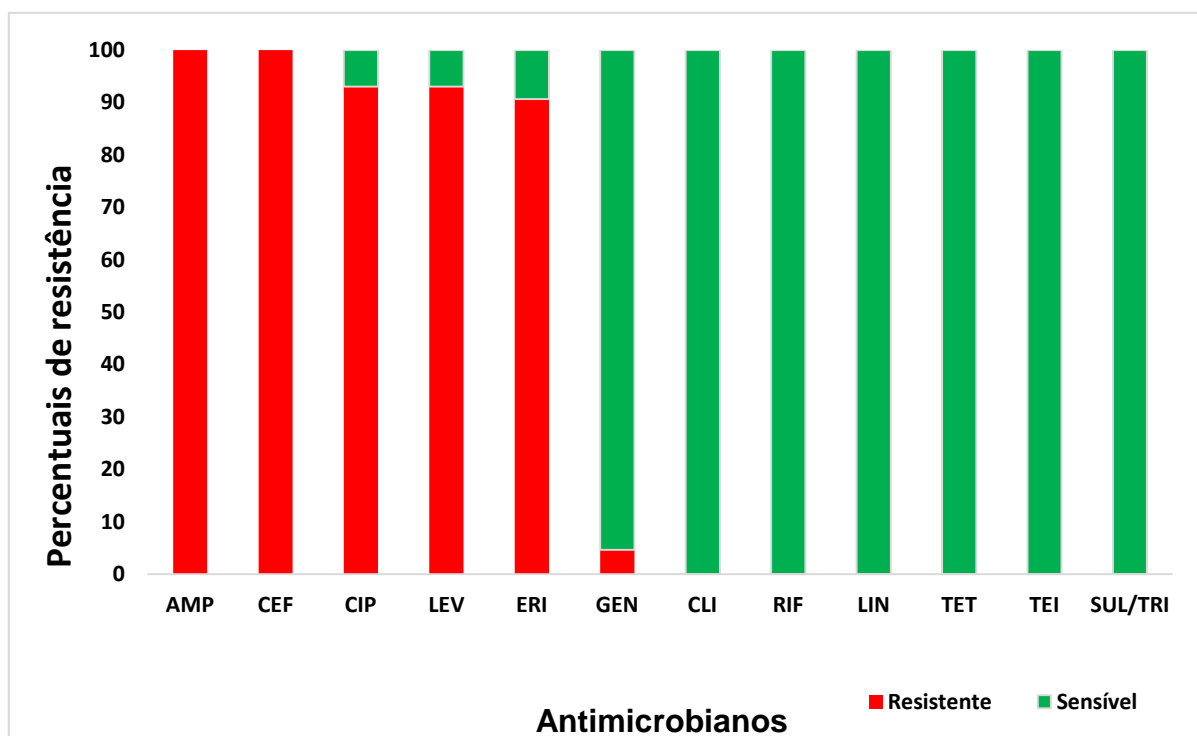
## TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras testadas estão apresentados no Gráfico 1.

A taxa de sensibilidade à gentamicina foi de 95,34% (41/43), seguido por eritromicina (9,3% - 4/43), levofloxacina e ciprofloxacina (6,9% - 3/43). Todas as amostras foram sensíveis a linezolida, rifampicina, teicoplanina e sulfametoxazol/trimetoprima.

Todas as amostras foram resistentes à oxacilina, com as CMIs variando entre 4 µg/mL a 64 µg/mL. A MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> foram de 16 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente. Todas as amostras apresentaram sensibilidade à vancomicina e daptomicina com as CMIs variando entre 0,5 µg/mL e 2 µg/mL para ambos (Tabela 7).





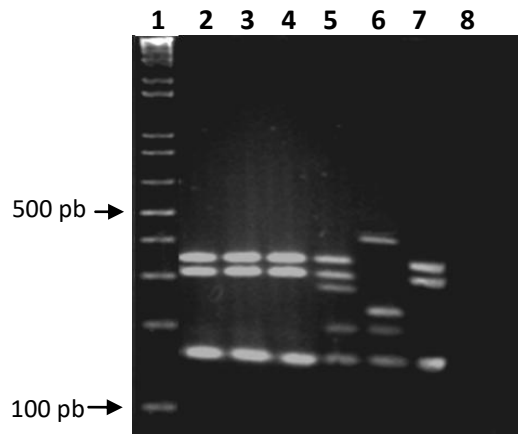
**Gráfico 1:** Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 43 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina deste estudo. AMP - ampicilina; CEF- cefoxitina; ERI - eritromicina; CIP - ciprofloxacina; LEV - levofloxacina; GEN - gentamicina; CLI - clindamicina; RIF - rifampicina; LIN - linezolidina; TET - tetraciclina; TEI - teicoplanina; SUL/TRI - sulfametoxazol e trimetoprima.

**Tabela 7:** Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de oxacilina, vancomicina e daptomicina das amostras analisadas neste estudo.

	CMI de oxacilina (µg/mL)					CMI de vancomicina (µg/mL)		CMI de daptomicina (µg/mL)	
	4	8	16	32	64	0,5-1	2	0,5-1	1,5-2
Nº de amostras	9	8	14	10	2	36	7	40	3

### TIPAGEM DO CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* (SCC*mec*)

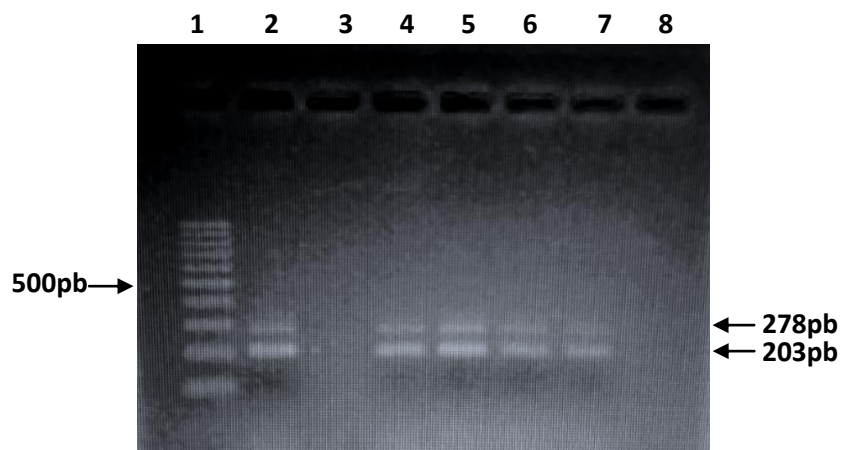
Todas as amostras analisadas foram classificadas como portadoras do SCC*mec* tipo IV (Figura 8).



**Figura 8:** Foto ilustrativa da eletroforese para tipagem do SCC*mec*. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de 1kb. Linhas 2 a 4: amostras clínicas do estudo com SCC*mec* tipo IV. Linha 5: Controle positivo do SCC*mec* tipo II. Linha 6: Controle positivo do SCC*mec* tipo III. Linha 7: Controle positivo do SCC*mec* tipo IV. Linha 8: amostra sensível à metilicina.

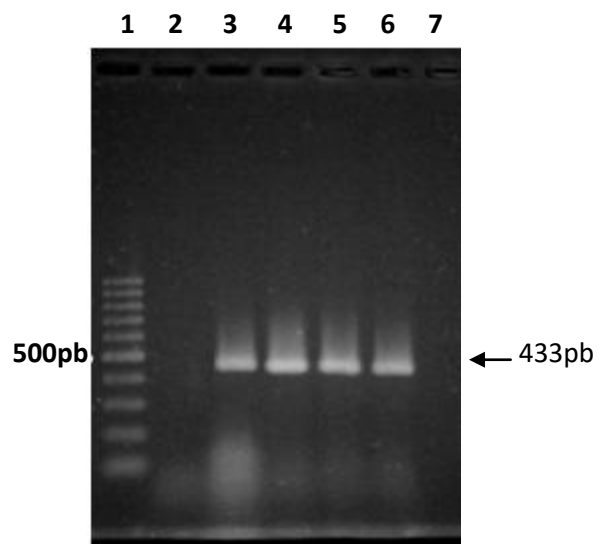
#### SUBTIPAGEM DO CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* TIPO IV

O SCC*mec* do tipo IVa foi predominante nas amostras deste estudo, estando presente em 38 (88,3%) isolados. Dois isolados apresentaram o SCC*mec* do tipo IVc e três isolados não amplificaram nenhum dos subtipos pesquisados (a-h). A associação dos tipos de SCC*mec* com as linhagens encontradas (resultados descritos adiante) encontram-se na Figura 14.

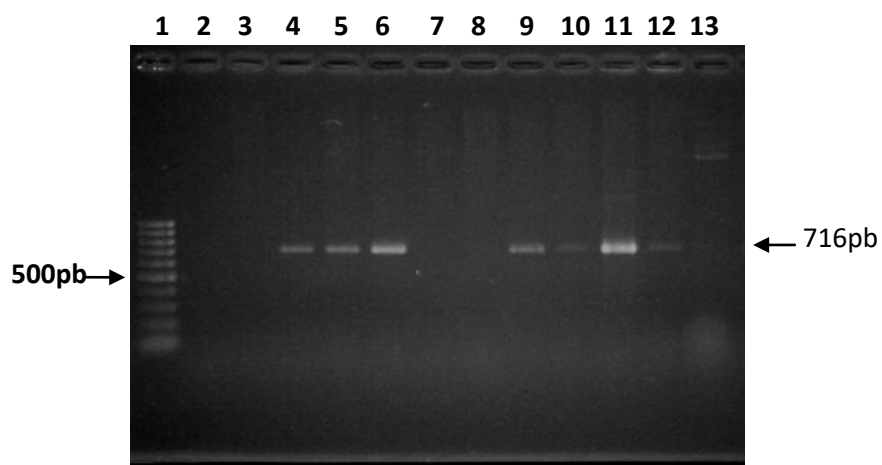


**Figura 9:** Foto ilustrativa da eletroforese da subtipagem do SCC*mec* tipo IV. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de 100pb. Linha 2: Controle positivo. Linha 3: Controle negativo. Linhas 4 a 7: amostras clínicas do estudo. Linha 8: Branco.





**Figura 11:** Foto ilustrativa da eletroforese para detecção dos genes codificadores da PVL. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de 100pb. Linha 2: Controle negativo. Linha 3: Controle positivo. Linhas 4 a 6: amostras clínicas do estudo. Linha 7: Branco.



**Figura 12:** Foto ilustrativa da eletroforese para detecção do gene *cna*. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de 100pb. Linha 2: Branco. Linha 3: Controle negativo. Linha 4: Controle positivo. Linhas 5 a 13: amostras clínicas do estudo.

## ANÁLISE DO PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO COM USO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Sma*I E SEPARAÇÃO EM GEL POR ELETROFERESE DE CAMPO PULSADO (PFGE).

Das 43 amostras analisadas neste estudo, 40 apresentaram o mesmo pulsotipo (A), que foram divididos em quatro subtipos, nomeados de A1 a A4. Predominantemente, as amostras deste pulsotipo foram agrupadas no subtipo A1, representando 81,3% (n= 35) do total, seguido pelo subtipo A2 (n=1 / 2,3%), subtipo A3 (n=3 / 6,9%) e subtipo A4 (n=1 / 2,3%). Outros três padrões de fragmentação foram detectados e agrupados em pulsotipos B (B1- B2) e C (Figura 14).

Utilizando como referência os padrões de fragmentação das principais linhagens de MRSA circulantes, descritos por MCDUGAL et al. (2003), foi realizada a análise e comparação das mesmas com as amostras do pulsotipo A. Foi possível identificar que as amostras deste pulsotipo pertencem à linhagem USA300.

### TIPAGEM DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA A (*spa* typing)

Foram identificados seis *spa* type distintos: t008, t433, t692, t1405, t1451 e t1767. O *spa* type t008 foi o prevalente, presente em 36 das 43 amostras (Figura 14), seguido do t433 (2/43) e t1451 (2/43). Os demais *spa* type só estavam presentes em uma amostra cada. A Figura 13 ilustra os produtos gerados nas reações de PCR para amplificação do gene *spa*.

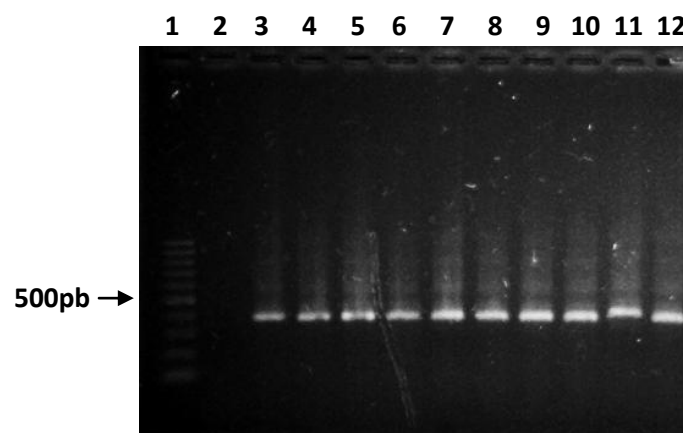


Figura 13: Foto ilustrativa da amplificação do gene que codifica a proteína A. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de 100pb. Linha 2: Controle negativo (branco). Linhas 3 a 12: amostras clínicas do estudo.

## MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

Três amostras, representativas de cada pulsotipo (subtipos A1, B1 e a única amostra do pulsotipo C), foram selecionadas para a realização do MLST.

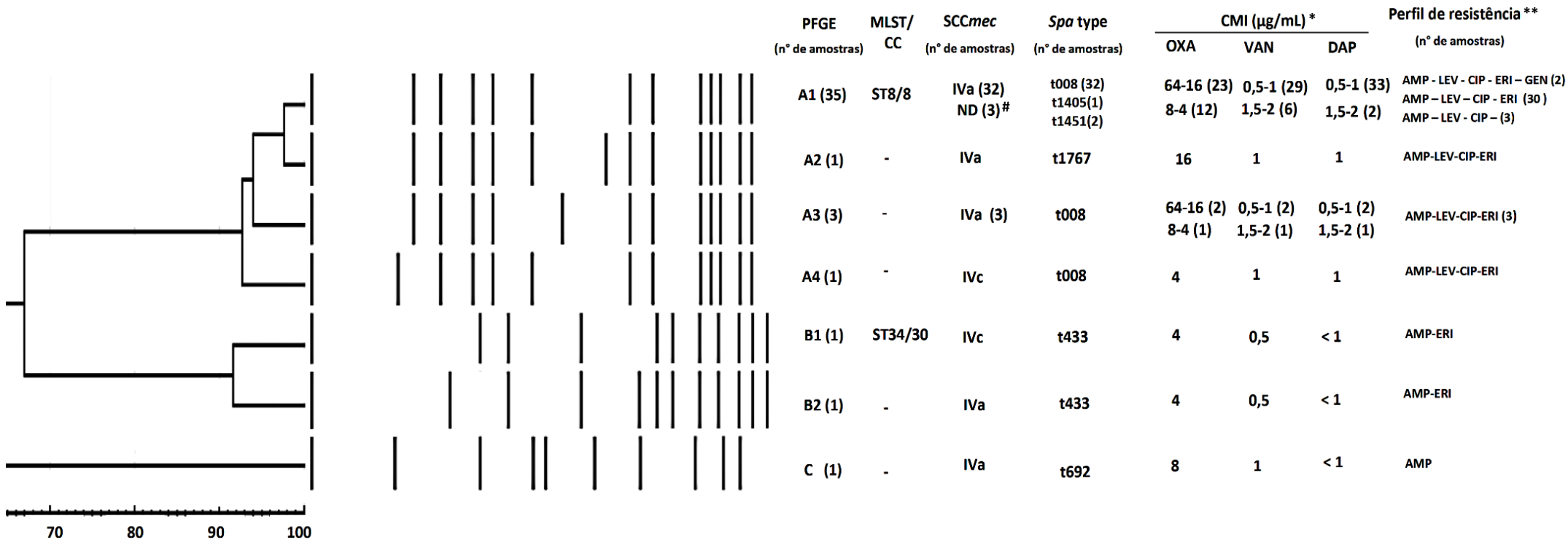
A amostra do subtipo A1 apresentou o ST8, pertencente ao CC8. O ST34/CC30 foi identificado na cepa do subtipo B1. A determinação do perfil alélico da amostra do pulsotipo C apresentou uma combinação ainda não descrita no banco de dados. O perfil alélico, o ST e o complexo clonal das amostras podem ser observados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Perfil alélico, *sequence type* e complexo clonal das três amostras selecionadas para a realização do *multilocus sequence type*.

Número da amostra / Padrão de PFGE	Perfis alélicos							<i>Sequence type</i>	Complexo clonal
	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>		
8GO / A1	3	3	1	1	4	4	3	ST8	CC8
25GO / B1	8	2	2	2	6	3	2	ST34	CC30
38GO / C	3	1	14	23	437	28	1	ND*	-

\*ND – não determinado

A Figura 14 apresenta as principais características genóticas e fenóticas das amostras do estudo agrupadas de acordo com as linhagens obtidas por PFGE.



**Figura 14:** Características moleculares e fenotípicas das 43 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina avaliadas neste estudo. \* CMI - concentração mínima inibitória; OXA - oxacilina; VAN - vancomicina; DAP - daptomicina. \*\* - CIP - ciprofloxacina; ERI - eritromicina; LEV - levofloxacina; AMP - ampicilina; GEN - gentamicina;; # ND - não determinado.

## 6. DISCUSSÃO

Embora muitos microrganismos encontrados nas mamas e no leite materno sejam comensais, vários são potencialmente patogênicos e podem causar infecções. Bactérias como *S. aureus* e *S. epidermidis* são os principais patógenos encontrados em infecções mamárias, porém, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas* também apresentam considerável frequência neste tipo de infecção (PATEL et al., 2017; TOGO et al., 2019; VALENTE & GROBMYER, 2018).

Em nosso estudo, a prevalência de *S. aureus* foi de 73,4%, semelhante à encontrada nos estudos de CULLINANE et al., (2015), RAMAKRISHNAN et al., (2017) e RIMOLDI et al., (2019) que obtiverem valores de 58% (16/27), 83% (103/124) e 78,3% (47/60), respectivamente. A prevalência de MRSA em infecções mamárias tem aumentado ao longo dos anos, porém, ainda varia geograficamente e é mais frequente em casos de abscessos mamários (BOCCACCIO et al., 2014; BELLINO, 2018). Do total de MRSA, 55,8% (n = 26) causaram abscessos mamários. A prevalência de abscessos foi muito próxima à encontrada por BASSETTI et al., (2018) no Brasil, onde MRSA ocorreu em 72% (36/50) dos casos. No entanto, no estudo de RUSSELL et al. (2020) feito na Irlanda com 108 pacientes, MRSA representou apenas 5,88% dos isolados, enquanto no estudo de RAMAKRISHNAN et al. (2017), realizado na Índia, não havia isolados de MRSA entre as 103 amostras do estudo.

A média de idade das pacientes deste estudo ( $27 \pm 8,2$  anos) foi similar a encontrada por DEBORD et al. (2016), na França e por O'BRIEN et al. (2019), na Irlanda. DEBORD et al. (2016) analisaram dados de 40 pacientes que buscaram atendimento para tratar abscessos nas mamas e observaram uma média de idade de 29,3 anos entre elas. O'BRIEN et al. (2019), por sua vez, avaliaram 36 prontuários de pacientes acometidas por mastite pós-puerperal e verificaram que a média de idade foi de 33,3 anos. O desenvolvimento de infecções de mama é mais frequente em mulheres entre 20 e 50 anos. Não há evidências que a idade materna seja um fator ligado a infecções de mama, no entanto, há a hipótese de que mães jovens teriam mais dificuldade em amamentar devido a inexperiência, o que levaria a estase do leite e conseqüente infecção. Por outro lado, em mães senis a dificuldade



parece estar relacionada ao fato das mesmas trabalharem fora ou possuírem grandes demandas de afazeres que impossibilitam a amamentação numa frequência maior (TAVEIRA & ARAÚJO, 2019).

Fatores de risco como o uso de bomba de leite ou protetor de mamilo não foram observados em nosso estudo, entretanto, foram descritos muitos relatos de ingurgitamento e dificuldade para amamentar. O uso de bombas e protetores de mamilo promove escoriações que servem de porta de entrada para patógenos, porém, as dificuldades na amamentação, assim como a pega inadequada do recém-nascido favorecem a estase do leite e rachaduras nos mamilos, fatores que também contribuem para a ocorrência de infecção nas mamas (ESPINOLADOCIO et al., 2016).

Entre os fatores socioeconômicos que podem contribuir para o desmame precoce e posteriores infecções estão o nível de escolaridade, a baixa renda e a ausência de companheiro (JOCA et al., 2005). Em nosso estudo, além do fator escolaridade, a associação com o uso do sistema de saúde público pode indicar que as pacientes arroladas neste estudo possuem uma situação econômica menos favorecida. Contudo, maior nível de escolaridade não parece ser um fator relevante para a não ocorrência de infecções de mama, conforme observado nos estudos realizados na China, realizado por TANG et al. (2014), que contou com 695 participantes e no Irã, onde ZARSHENAS et al. (2017) avaliaram 972 pacientes. Ambos os estudos apresentaram pacientes com alto nível de escolaridade e que ainda assim foram acometidas por infecção mamária. Além disso, em nosso estudo, 68,8% das pacientes declararam seu estado civil como solteira, fator considerado de risco para o desmame (VIDUEDO et al., 2015).

As cepas deste estudo apresentaram resistência a poucos antimicrobianos. O perfil das amostras, sendo resistentes aos beta-lactâmicos e eritromicina e sensíveis à clindamicina, corrobora com o padrão USA300 não multirresistente. Normalmente, o clone USA300 é suscetível a diversos agentes antimicrobianos, com exceção da oxacilina e eritromicina, contudo, alguns estudos têm relatado a resistência a outros antimicrobianos (fluoroquinolonas, tetraciclina, clindamicina, gentamicina e mupirocina). Em 2007, HAN et al. (2007) descreveram a alta frequência de isolados USA300 resistentes a clindamicina e tetraciclina em um ambulatório em Boston – EUA. Esse estudo,

conduzido com 123 pacientes, identificou duas linhagens de USA300: USA300-0114 e USA300-0247. Quarenta e nove por cento (36/73) dos isolados da linhagem USA300-0114 apresentaram resistência à clindamicina e outros 14% (10/73) foram resistentes à tetraciclina. A linhagem USA300-0247 apresentou porcentagens ainda mais expressivas quando comparada com a linhagem USA300-0114. Na linhagem USA300-0247, 22 dos 29 isolados apresentaram resistência à clindamicina e 21 à tetraciclina. No ano de 2010, foi publicado o estudo conduzido por MCDUGAL et al. no qual investigaram 823 isolados de USA300 (13 padrões de fragmentação distintos) e destes: 72 (9%) eram resistentes à tetraciclina, 51 (6,2%) resistentes à clindamicina, 22 (2,7%) resistentes à mupirocina, 5 (0,6%) resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol e 7 (0,9%) eram resistentes à gentamicina. Fora dos EUA a prevalência de USA300 é baixa e a resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, também é reduzida. Um estudo realizado por EGYIR et al. (2015), em Gana, com 30 isolados de diversas fontes, relatou quatro cepas com resistência às fluoroquinolonas (moxifloxacino e norfloxacino) e canamicina (aminoglicosídeos). Em nosso estudo, apenas dois isolados apresentaram resistência à gentamicina e 40 às fluoroquinolonas ciprofloxacina e levofloxacina.

Através das análises moleculares, constatamos a presença do USA300, com ST8, PVL positivo, SCC*mec* IVa e com predominância do t008 sendo disseminado nas infecções mamárias nas pacientes. Comparando o perfil de bandas com os perfis descritos amplamente na literatura para as linhagens USA300 observamos que trata-se das linhagens USA300 norte-americana (MCDUGAL et al., 2003; SANCHINI et al., 2013; SEIDL et al., 2014; JUNG et al., 2016; ENSTRÖM et al., 2018).

O primeiro registro de amostras do clone USA300 no Brasil foi realizado por RIBEIRO et al. 2005, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. A bactéria foi isolada em 2003 de um paciente atendido em um ambulatório da cidade. Posteriormente, em 2007, RIBEIRO et al. novamente identificaram um isolado com o padrão de fragmentação do USA300, isolado de um paciente com infecção respiratória também na cidade de Porto Alegre. Após a primeira identificação em território brasileiro, isolados de USA300 não foram muito relatados nas últimas duas décadas. Cronologicamente, SCHUENCK et al.,

(2009), analisaram 20 MRSA oriundos de hospitais no Rio de Janeiro e descreveram uma cepa com características moleculares de USA300 isolada de ferida. Posteriormente, ROSSI et al. (2014) relataram em São Paulo uma cepa USA300 em infecção de corrente sanguínea. Mais recentemente, ZUMMA et al., (2017) analisaram 61 MRSA obtidos de corrente sanguínea oriundos de cinco hospitais distintos no Rio de Janeiro e identificaram duas cepas de USA300. Por fim, BRIDE et al., (2019) investigaram 67 cepas na capital do Espírito Santo, entre elas MSSA e MRSA, e identificaram três cepas de USA300 provenientes de feridas e abscessos.

O *spa* type t008 foi predominante em nosso estudo (n = 36), no entanto, para o mesmo pulsotipo (A) foram encontrados outros *spa* types. No estudo realizado por SEIDL et al., (2014), diferentes *spa* types foram encontrados para variantes do clone USA300. Os tipos encontrados foram t121 e t197, enquanto em nosso estudo foram os *spa* types t1405, t1451 e t1767. No estudo conduzido por STRAUSS et al. (2017) sobre a origem do USA300, foram encontrados os *spa* type t121 e t112 em cepas isoladas na África, mas que estariam relacionadas ao ancestral comum do USA300 norte-americano (USA300-NAE). No Brasil, o estudo realizado por ROSSI et al. (2014) encontrou o *spa* type t292 em uma cepa USA300 (MRSA IVa PVL-negativo e ACME-negativo) isolada de infecção sanguínea. Outros *spa* types já foram documentados no Brasil (t002, t004, t242, t318, t371, t964, t4912), porém, intimamente relacionados ao ST5/CC5 e ST30/CC30, os mais prevalentes no Brasil (CARVALHO et al., 2017; PEREIRA-FRANCHI et al., 2019; RAMUNDO et al., 2016). De acordo com o banco de dados do servidor *spa* Ridom, com exceção do *spa* type t1405, que foi relatado apenas em uma cepa MSSA na Suécia até o momento, os tipos t008, t1451 e t1767 já foram amplamente relatados na Europa e América do Norte em cepas de MRSA com ST8.

A análise da origem da disseminação das cepas é um ponto relevante em nosso estudo. Apesar da semelhança genética entre elas (pulsotipo A), não há indicação de que as pacientes tenham contraído a bactéria de uma origem comum. As pacientes residem em locais distintos e foram hospitalizadas para a realização do parto em maternidades/hospitais diferentes de onde foram coletadas amostras de infecção mamária (HUCAM). De modo contrário ao nosso estudo, o trabalho realizado por SANCHINI et al, (2013), na Itália,

identificou a ocorrência de um surto de USA300 dentro de uma maternidade e tanto a mãe quanto os neonatos foram acometidos (n = 17).

A presença de PVL nas cepas do USA300 contribuiu para este clone se tornar o CA-MRSA mais virulento (DIEP et al, 2016). Esta leucocidina está associada a complicações em casos de pneumonia. Um estudo realizado em coelhos infectados com cepas USA300 PVL-positivo e USA300 PVL-negativo indicou um papel significativo desta leucocidina no desenvolvimento de pneumonias graves. Os pulmões dos coelhos infectados com cepa USA300 PVL-positivo sofreram diversos danos, comprovando que a PVL aumenta a capacidade de USA300 em causar edema pulmonar, hemorragia alveolar, hemoptise e morte, características clínicas de pneumonia necrosante (DIEP et al., 2010; DIEP, et al, 2016).

Em nosso estudo, todas as amostras apresentaram o gene da PVL. No estudo conduzido por TAKADAMA et al. (2018) foram isolados 3.433 *S. aureus* de diversas fontes em nove hospitais coreanos, o gene *lukS/F-PV* foi detectado em 64 dos 3.433 dos isolados. Dos 64 isolados positivos para *lukS/F-PV*, 42 (65,6%) foram identificados como pertencentes à linhagem USA300. No estudo conduzido por SEIDL et al. (2014), durante os anos de 2001 a 2013 na Suíça, a presença de PVL em isolados USA300 foi ainda maior, sendo encontrado em 95,7% do total 45/47). Durante os anos de 2017 e 2018, GUARDABASSI et al. (2019) investigaram 152 isolados de *S. aureus* obtidos de diversas fontes na região do Caribe e observaram que 61 dos 152 dos isolados eram pertencentes a linhagem USA300 e todos carregavam o gene *lukS/F-PV*. A frequência de *lukS/F-PV* em isolados USA300-LV também é alta (ARIAS et al., 2017)

Outros clones de CA-MRSA, além do USA300, também podem carrear o gene da PVL, como por exemplo, clone USA400 (ST1-MRSA-IV), clone da Oceania (ST30-MRSA-IV), clone europeu (ST80-MRSA-IV), clone de Queensland (ST93-MRSA-IV) e clone de Taiwan (ST59-MRSAIV) (MEDIIVILLA et al, 2012).

As cepas de *S. aureus*, comumente, possuem genes que codificam citotoxinas, como *hla* e outras leucocidinas que causam lise de células fagocíticas (DIEP et al., 2016). Em um estudo comparativo, realizado por KING et al. (2016), foi avaliada a diferença de virulência entre isolados das linhagens USA100, USA200, USA300, USA400 e USA600. Esses autores

apontaram USA100 e USA300 como as maiores produtoras de hemólise em placas contendo sangue de coelho, destacadamente o clone USA300, onde 83% (10/12) dos isolados causaram zonas de hemólise maiores que 200mm<sup>2</sup>. Além disso, foram detectados os genes *hla* e *hly* em todos os isolados. O gene *hla* causa lise em diversos tipos de células, como eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e alguns leucócitos. Apesar de não ser letal, esta toxina pode modular respostas celulares, como a liberação de óxido nítrico do endotélio e a produção de citocinas pró-inflamatórias (INOSHIMA et al., 2011; POPOV et al., 2015). Poucas amostras de *S. aureus* carregam o gene *hly* e seu papel ainda não foi totalmente esclarecido, acredita-se que esteja envolvido na evasão e sobrevivência de *S. aureus* no corpo humano (TAM & TORRES, 2018).

O perfil de virulência encontrado nas amostras deste estudo foi semelhante ao da cepa hipervirulenta de USA300 descrita por MCCLURE & ZHANG (2017), que foi isolada de um caso letal de pneumonia necrosante que ocorreu durante um surto em 2004 no Canadá. Diversos genes foram detectados, incluindo *fnbB*, *clfA*, *hla*, *hly* e *hlg*. Delta hemolisinas (*hlg*) estão presentes em, aproximadamente, 99% dos *S. aureus* e causam lesão e inflamação aguda do tecido. Estudos utilizando modelo murino de infecção demonstraram a contribuição dessas hemolisinas uma vez que amostras que não são produtoras de *hlg* causam menos lise de neutrófilos e inflamação, permitindo uma sobrevida ao hospedeiro (SPAAN et al. 2014). No Brasil, um estudo realizado com 119 isolados de feridas e narinas relatou altas frequências dos genes *hla*, *hly* e *hly* em cepas circulantes, porém, os genes que codificam a PVL foram detectados apenas em três cepas (PEREIRA-FRANCHI et al. 2019)

Apesar de vários mecanismos de virulência de *S. aureus* parecerem redundantes, eles são responsáveis pelo sucesso desta bactéria em evadir o sistema imunológico e manter a infecção por mais tempo. Durante sua evolução, *S. aureus* adquiriu diversos fatores para poder colonizar e se adaptar a diferentes sítios, a exemplo a via de arginina desiminase (*arc*) e o sistema de permeação de oligopeptídeos (*opp-3*), que promovem o aumento da virulência e da capacidade de colonizar a epiderme, no entanto, não parecem desempenhar qualquer papel na permanência da bactéria em superfícies plásticas ou na invasão celular (WU et al., 2020).

A disseminação de um clone hipervirulento em nutrizes, como relatado no presente estudo, é alarmante, uma vez que, além de possivelmente causar danos teciduais a mama, compromete a integridade do alimento e desenvolvimento do neonato. Este trabalho e seus resultados evidenciam a importância de estudos mais aprofundados em relação a esse assunto. Estudos epidemiológicos quando enriquecidos com análises moleculares podem fornecer uma melhor compreensão de certas enfermidades e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de manejo e tratamento. O conhecimento dos agentes etiológicos colabora para a vigilância epidemiológica e auxilia no monitoramento de surtos e disseminação de patógenos dentro e fora dos hospitais.

## 7. CONCLUSÕES

Após os resultados observados, podemos concluir que:

- Nosso estudo demonstrou uma elevada taxa de isolamento de MRSA em infecções mamárias neste hospital.
- As amostras apresentaram resistência a poucas classes de antimicrobianos utilizadas na prática clínica, demonstrando que diversas opções terapêuticas ainda podem ser utilizadas com segurança pela parturiente.
- A elevada presença dos genes da PVL em isolados causando infecções em lactantes é extremamente preocupante, uma vez que estas amostras são, muitas vezes, mais virulentas que outras e, com isso, tendem a causar danos mais severos ao tecido mamário, podendo ocasionar perda de função e danos estéticos à mama.
- Além dos genes da PVL, as amostras também apresentaram altas taxas de genes de hemolisinas, *clfA* e *clfB*, que contribui ainda mais para a virulência destes isolados.
- O clone USA300 norte-americano (SCC*mec* IVa, ST8/CC8, *spa* type t008 e PVL positivo) foi encontrado em mais de 90% dos isolados de MRSA, indicando uma disseminação do mesmo em nossa região e neste tipo de paciente.
- Aparentemente, não houve qualquer ligação epidemiológica entre as pacientes que justifique a infecção por cepas de um mesmo clone. Diante disto, é possível aventar que este clone esteja presente em diferentes hospitais/maternidades e que as parturientes o estejam contraindo durante a internação para a realização do parto ou mesmo que estejam sendo disseminadas na comunidade.

- Estudos mais completos em nível molecular para infecções mamárias são escassos. Este é o primeiro estudo a realizar análises moleculares de cepas de infecções mamárias de MRSA no Brasil e a descrever a disseminação da linhagem UA300 neste tipo de infecção.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-FIGUEIREDO, M. & LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiol.** v.21, n.16, p.1-9, 2016.

ARIAS C.A. et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. **Antimicrob Agents Chemother.** v.61, n.10, p. 1-12, 2017.

ASCOM & ANVISA. Semana mundial de aleitamento materno: A vigilância sanitária pode incentivar a amamentação. Disponível em <<https://bit.ly/30iBGOk>> Acesso em 03/04/2016.

BAIG,S , JOHANNESSEN,TB ,OVERBALLEPETERSEN,S , LARSEN,J , LARSEN,AR , STEGGER,M . Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect. Genet. Evol.** v.61, p.74-76. Jul. 2018.

BALLHAUSEN, B. et al. The *mecA* Homolog *mecC* confers resistance against -lactams in *Staphylococcus aureus* irrespective of the genetic strain background. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.58, n. 7, p. 3791–3798, 2014.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray P. R.; Baron, E. J.; Jorgesen, J. H.; Pfaller, M.A.; Tenover, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 8a ed. Washington (DC): ASM Press, v. 1, p. 384-404, 2003.

BANNERMAN, T. L. A. & PEACOCK, S. J. *Staphylococcus, Micrococcus* and other *catalase-positive cocci*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Pfaller, M. A., 9th ed., ASM Press, Washington, D.C., v. 2, p. 390-411, 2007.

BASSETTI, B. R. et al. Microbiological profile of breast abscess in the gynecology and obstetrics care service of a philanthropic hospital in Vitória, ES,

Brazil. **Global Advanced Research Journal of Microbiology**, v. 7 n.2 p. 037-039, Apr. 2018.

BELLINO, S., et al. AR-ISS: Sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Italia. Rapporto del quinquennio 2012–2016 [Antibiotic resistance Italian Health Institute: Surveillance of antibiotic resistance in Italy 2012–2016]. **Istituto Superiore di Sanità**, Rome, Italy, 2018.

BERENS, P. D. Breast pain: Engorgement, nipple pain, and mastitis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 58, n. 4, p. 902–914, 2015.

BHATTACHARYA, P. K. Emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended spectrum beta lactamases, and multi-drug resistance is a problem similar to global warming. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.47, n.6, p.815-816, Dec. 2014.

BLANCA ESPÍNOLA-DOCIO, D. et al. Mastitis. Puesta al día Mastitis update. **Arch Argent Pediatr**, v. 114, n. 6, p. 576–584, 2016.

BOCCACCIO, C. et al. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en abscesos de mama en una maternidad pública. **Medicina (Argentina)**, v. 74, n. 3, p. 210–215, 2014.

BOUTET G. Breast inflammation: clinical examination, aetiological pointers. **Diagn. Interv. Imaging**. v.93 n.2, p.78-84, Feb. 2012.

BRAKSTAD, O. G. AASBAKK, K. AND MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **J Clin. Microbiol.** V.30, n.7, p.1654–1660, Jul. 1992.

BRANCH-ELLIMAN, W. et al. Risk factors for *Staphylococcus aureus* postpartum breast abscess. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 71–77, 2012.

BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, versão 9.0, 2019.

BRIDE, L.L. et al. Differences in resistance profiles and virulence genes among methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of

different lineages at a public tertiary hospital. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.** v.52, p.1-7, 2019.

BUCHAN et al. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. **Microbiology (Reading).** V.165 n.4, p.367-385, 2019.

CAIAFFA - FILHO H.H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC *mec* type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis** v.76, p.518 – 520, 2013.

CALIL, VMLT, FALCÃO, MC. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Rev. Med.** São Paulo, v. 82, p.1-10 jan. 2003.

CARVALHO, S. P. D. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 464–467, 2017.

CHAMBERS, H. F & DELEO, F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. **Nat. Ver. Microbiol.** v.7, n.9, p.629–641. Sep. 2009.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2020.

CONTRERAS, G. A & RODRÍGUEZ, J.M. Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. **J. Mam. Gland. Biol. Neo.** v.16, p.339–356, 2011.

CORREA, O. DELGADO, K. RANGEL,C. BELLO, A. REYES,N. Nasal and vaginal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pregnant women in Cartagena, Colombia. **Colomb. Med.**, Cali, v.43, n.1, p.19-27, Jan. 2012

CULLINANE, M. et al. Determinants of mastitis in women in the CASTLE study: A cohort study. **BMC Family Practice**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2015.

DAVID M.Z & DAUM R.S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clin.Microbiol. Rev.** V.23, n.3, p.616-87, Jul. 2010.

DAYAN et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines.** v.15, p.1373-1392, 2016.

DEBORD, M. P. et al. Lactational breast abscesses: Do we still need surgery? **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v.4 p. 1-8, 2015.

DEL BONO, E. & RABE, B. Breastfeeding and child cognitive outcomes: Evidence from a hospital-based breastfeeding support policy. **Inst. For Soc. and Econ. Res.** n. 2012-29, Dec. 2012.

DENER, C. & INAN, A. Breast Abscesses in Lactating Women. **World J. Surg.** v.27, p.130–133, 2003.

DEURENBERG, R.H. & STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Genet. Evol.** v. 8, n. 6, p. 747-63, 2008.

DIEP, B. A. et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.367: p.731–39, 2006.

DIEP, B.A. et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the usa300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases** v.197, p.1523–30, 2008.

DIEP B. A. et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton- Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. **Proc Natl Acad Sci** v.107, p.5587–5592, 2010.

DUARTE, F. C. et al. Disseminated Clonal Complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type II in a tertiary hospital of Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]**. vol.60, e32, P.1-5, 2018.

EIDELMAN, A, I. Breastfeeding and the Use of Human Milk: An Analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 Breastfeeding Policy Statement. **BREAS. MED.** v. 7, n. 5, 2012.

EGEA, A. L. et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. **Int J Med Microbiol** .V.304, p.1086-99, 2014.

EGYIR, B. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Ghana include USA300. **J Glob Antimicrob Resist.** V. 3,p. 26-30, 2015.

ENRIGHT, M.C., DAY, N.P., DAVIES, C.E., PEACOCK, S.J., SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J of Clin. Microb.** v. 38, p.1008-1015, 2000.

ENSTRÖM, J. USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Stockholm, Sweden, from 2008 to 2016. **Plos One.** V.7, 2018.

ESPÍNOLA-DOCIO, B., COSTA-ROMERO, M., DÍAZ-GÓMEZ, N. M. E PARICIO-TALAYERO, J. M. Mastitis. Puesta al día (Mastitis update). **Arch. Argent. Pediatr.** v.114, n.6, p.576-584, 2016.

FIGUEIREDO, A. M. S. What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? **Virulence.** V. 8, N. 6, p.640–642, 2017.

FOSTER, T. J. GEOGHEGAN, J. A. GANESH, V. K.AND HÖÖK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microb.**v. 12 p. 49-62. Jan. 2014.

GELATTI, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 34-38, 2013.

GORBACH, S.L. Antimicrobial resistance in the1990s. **Infect. Dis. Clin. Prac.**, v. 5, p. 32-36, 1996.

GORDON, R.L. & LOWY, F.D. Pathogenesis of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clin Infect Dis.**, v. 46, n. 5, p. 350–359, 2008.

GORWITZ, J. R. et al. Strategies for Clinical Management of MRSA in the Community: Summary of an Experts' Meeting Convened by the Centers for Disease Control and Prevention. **Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention.** 2006.

GOULD, I. M., DAVID, M. Z., ESPOSITO, S., GARAU, J., LINA, G., MAZZEI, T., & PETERS, G. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Inter. J of Antim. Agen.* V.39, n.2, p.96–104, 2012.

GUARDABASSI, L. et al. High prevalence of USA300 among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on St. Kitts and Nevis, West Indies. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, p. 1–7, 2019.

HALLIN, M, FRIEDRICH, AW & STRUELENS, MJ 2009, spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols.* vol. 551, p. 189-202.

HAN, L. L. et al. High frequencies of clindamycin and tetracycline resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Pulsed-Field Type USA300 isolates collected at a Boston ambulatory health center. **J Clin. Microbiol.** v. 45, n. 4, p. 1350–1352, 2007.

HANAHA, T. Skin and Soft Tissue Infections Caused by Different Genotypes of PVL-Positive Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Jpn. J. Infect. Dis.**v.73, p. 72–75, 2020.

HARMSSEN D, CLAUS H, WITTE W, ROTHGÄNGER J, CLAUS H, TURNWALD D, VOGEL U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. **J Clin. Microbiol.** V.41, n.12, p.5442-8, Dec. 2003.

HARRIS, S. R. et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. **Lancet Infect Dis.** V.13, p. 130–36, 2013.

INOSHIMA, I. et al. A *Staphylococcus aureus* Pore-Forming Toxin Subverts the Activity of ADAM10 to Cause Lethal Infection. **Nat Med.** V.17, p.1310–1314, 2009.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassettes chromosomally integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1323 – 1336, 2001.

JARRAUD S, MOUGEL C, THIOULOUSE J, LINA G, MEUGNIER H, FOREY F, NESME X, ETIENNE J, VANDENESCH F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infect Immun.** V.70, n.2, p.631-41, Feb. 2002.

JOCA et al. Fatores que contribuem para o desmame precoce. **Esc Anna Nery R Enferm;** v.9 n.3, p. 356 – 64, 2005.

JIMÉNEZ, J. N. et al. CC8 MRSA Strains Harboring SCCmec Type IVc are Predominant in Colombian Hospitals. **Plos One.** V.7, n.6, 2012

JUNIE, L. M. et al. Molecular epidemiology of the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones: A synthetic review. **Clujul Medical,** v. 91, n. 1, p. 7–11, 2018.

JUNG, J. et al. Emergence of Panton-Valentine leucocidin-positive ST8-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300 clone) in Korea causing healthcare-associated and hospital-acquired bacteraemia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** p.1-7. 2016.

KATARIA, K. SRIVASTAVA, A. AND DHAR, A. Management of Lactational Mastitis and Breast Abscesses: Review of Current Knowledge and Practice. **Indian. J Surg.** v. 75, n.6, p.430–435, Nov/Dec. 2013.

KAYA,H, HASMAN,H ,LARSEN,J , STEGGER,M , JOHANNESSEN,TB , ALLES OE,RL , LEMVIGH,CK , AARESTRUP,FM , LUND,O , LARSEN,AR .SCCmec Finder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. **Clin. Sci. and Epidem.** v. 3, n.1, Jan/Feb. 2018.

KLEVENS, R. M. et al. Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992–2003. **Clinical Infectious Diseases**, V.42, N.3, P. 389–391, 2006.

KÖSER, CLAUDIO U. et al. Rapid Whole-Genome Sequencing for Investigation of a Neonatal MRSA Outbreak. **N Engl J Med.** N.366, p.2267–2275, 2013.

LAKHUNDI, S. & ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clin. Microb. Revi.** v. 31 n. 4 2018.

LA OSSA et al. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? **Braz J Infect Dis.** 2018 v.22 e.5, p.371–376, 2018.

LEE et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature Reviews Disease Primers v.4, n.18033, 2018.

LINA, G.; PIÉMONT, Y.; GODALL-GAMOT, F.; BES, M.; PETTER, M. O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESH, F. & ETIENNE J. Involvement of Panton Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* primary skin infections and pneumoniae. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 1128-1132, 1999.

LIU, J; CHEN, D; PETERS, B. M; LI, L; LI, B.; XU, Z.;SHIRLIFF, M. E. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Micro. Pat.** v.101, n.56, p.56-64, 2016.

LIPINSKA U. et al. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. **PLoS One** v.6, 2011.



MCDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113–5120, 2003.

MCCLURE, JO-ANN & ZHANG, KUNYAN. Complete genome sequence of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hypervirulent strain, USA300-C2406, isolated from a patient with a lethal case of necrotizing pneumonia. **Genome Announc.** v.5. n.22, p.1-3, 2017.

MEDIAVILLA, J.R. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Current Opinion in Microbiology**. v.15, p.588–595, 2012

MILHEIRIÇO, C., OLIVEIRA, D.C., DE LENCASTRE, H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. **Antim. Agen. and Chem.** V.51, n.9, p.3374-3377, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Portaria nº 2616 de 13 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 15 maio 1998.

MONACO, M. et al. Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v.409, p.21–56, 2017.

NICHOL, K. A. et al. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada. **J Antimicrob Chemother** v.68, p.47–55, 2013.

NIMMO, G. R & COOMBS, G. W. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. **Int J Antimicrob Agents**. V.31, P.401-10, 2008.

NIMMO, G. R. USA300 abroad: Global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 8, p. 725–734, 2012.

O'BRIEN, C. et al. Breast abscess: Not just a puerperal problem. **The Breast Journal**. p.1–4, 2019

OLIVEIRA, D. BORGES, A. & SIMÕES, M. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**. V.10, n.252,p.1-19, 2018.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus*: toxins. **Curr Opin Microbiol**. v.32, n.37, p. 1-11. Fev., 2015.

PATEL, S. H. et al. Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

PEREIRA-FRANCHI, E. P. L. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Brazilian primary health care system. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 3, p. 339–347, 2019.

POPOV, L. M. et al. The adherens junctions control susceptibility to *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. **PNAS**, vol. 112, n. 46, p.14337–14342, 2015.

RAHIMI, F. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur **J Microbiol**. V.9, n.1, p.1-6, Jan. 2016.

RAMAKRISHNAN, R. et al. Analysis of the microbial flora in breast abscess: a retrospective cohort study conducted in the emergency department. **International Surgery Journal**, v. 4, n. 7, p. 2143, 2017.

RAMUNDO, M. S. et al. A unique SaeS allele overrides cell-density dependent expression of saeR and lukSF-PV in the ST30-SCCmecIV lineage of CA-MRSA. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 6, p. 367–380, 2016.

RASIGADE, J. P. et al. A history of Pantón-Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated pneumonia. **Vaccine**, v. 29, n. 25, p. 4185–4186, 2011.

RASIGADE, J.P. & VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.510–514, 2014.

REYES J, et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. **Clin Infect Dis.** V.49, p.1861-7, 2009.

RIMOLDI, S. G. et al. The Role of *Staphylococcus aureus* in Mastitis: A Multidisciplinary Working Group Experience. **Journal of Human Lactation**, 2019.

ROSSI, F. et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **N Engl J Med.** v. 370, n.16, p.1524–1531, Apr. 2014.

RUSSELL, S. P. et al. Breast infections – Microbiology and treatment in an era of antibiotic resistance. **Surgeon**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2020.

SANCHINI, A. et al. Outbreak of skin and soft tissue infections in a hospital newborn nursery in Italy due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. **Journal of Hospital Infection** v.83, p. 36-40, 2013.

SCHLEIFER, K.-H & BELL, J.A. *Staphylococcus*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1-43. 2015.

SEIDL, K. et al. USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland between 2001 and 2013. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1118–1122, 2014.

SPAAN et al. The *Staphylococcal* Toxins  $\gamma$ -Hemolysin AB and CB Differentially Target Phagocytes by Employing Specific Chemokine Receptors. **Nat Commun.** V. 5: n.5438, 2015.

STEFANI, S., CHUNG, D. R., LINDSAY, J. A., FRIEDRICH, A. W., KEARNS, A. M., WESTH, H., & MACKENZIE, F. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **Inter. J. of Anti. Age.**, 273–282, v.39 n.4, 2012.

STRAUSS, L. et al. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 49, p. E10596–E10604, 2017.

- TAGINI, F. & GREUB, G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** V.36, p.2007-2020, 2017.
- TAKADAMA, S. et al. Dissemination of Panton-Valentine leukocidine positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in multiple hospitals in Tokyo, Japan. **Clin Microbiol Infect.** V.24, n.1211, p.1-7, 2018.
- TAM, K. & V.J. TORRES. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. **Microbiol Spectrum** v.7, P.1-34, 2018.
- TANG, L. et al. Mastitis in Chinese breastfeeding mothers: A prospective cohort study. **Breastfeeding Medicine**, v. 9, n. 1, p. 35–38, 2014.
- TAVEIRA, A. M. & ARAÚJO, A. Aleitamento materno na perspectiva de mães adolescentes: contribuições para atenção primária à saúde. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro.** V.9, e3118, p.1-8, 2019.
- TAYLOR, N. et al. High performing hospitals: a qualitative systematic review of associated factors and practical strategies for improvement. **BMC Health Services Research** v.15, 2015.
- TENOVER, F. C. & GOERING, R. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** V.64, p. 441–446, 2009.
- TOGO, A; DUFOUR, J. C; LAGIER, J. C; DUBOURG, G; RAOULT, D & MILLION, M. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. **Future Microbiol.**, P.1-19, 2019.
- TONG, S. Y, C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews.** V.28 N. 3, 2015.
- TURNER, A. N. et al. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology.** 2019.
- TRISTAN, A.; YING, L.; BES. M.; ETIENNE, J.; VANDENESH, F. & LINA, G. Use of multiplex PCR do identify *S. aureus* adhesions involved in human haematogenous infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4465-4467, 2003.

VALENTE, S. A.; GROBMYER, S. R. Mastitis and breast abscess. In: **The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases**. [s.l: s.n.]. p. 93-103, 2018.

VAKILI et al. Enzima estafilocinase: uma visão geral da estrutura, função e formas projetadas. **Curr Pharm Biotechnol**. v.18 n.13p.1026-1037, 2017.

VAN BELKUM. A; TASSIOS, P.T; DIJKSHOORN, L; HAEGGMAN, S;; COOKSON, B; FRY, N.K; FUSSING, V; GREEN, J; FEIL, E; GERNER-SMIDT, P; BRISSE, S; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin. Microbiol. Infect**. v. 3, p. 01-46, 2007.

VIDUEDO A.F. et al. Severe lactational mastitis: particularities from admission. **Rev Bras Enferm**. v.68. n.6, p.806-11, 2015.

VIVONI, A.M.; NETTO-DOS-SANTOS, K.R.; DE-OLIVEIRA, M.P.; GIAMBIAGIDEMARVAL, M.; FERREIRA, A.L.P.; RILEY, L.W. & MOREIRA, B.M. Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 26, p. 662-667, 2005.

WU, K. et al. Arginine catabolic mobile element in evolution and pathogenicity of the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. **Microorganisms**. v.8, n.275, p.1-22, 2020.

YU, SUN & ZHANG. High-Risk Factors for Suppurative Mastitis in Lactating Women. **Med Sci Monit**, v.24, p. 4192-4197, 2018.

ZARSHENAS, M. et al. Incidence and Risk Factors of Mastitis in Shiraz, Iran: Results of a Cohort Study. **Breastfeeding Medicine**, v. 12, n. 5, p. 290–296, 2017.

ZUMMA, A. V. P. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non- beta-lactam antibiotics. **Brazilian journal of microbiology**, v.48, p.237–241, 2017.