

ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEM HOSPITALAR E COMUNITÁRIA

Pedro Marquetti Pereira (PIBIC/CNPq), Nattaly Bonacin Pinto, Sheila Alexandra Belini Nishiyama, Maria Cristiana Pereira Farias Pinto, Márcia Maria dos Anjos Szczerepa, Franciele Viana Fabri, Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientador), e-mail: ra89456@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia, Microbiologia Médica

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Clonalidade, Bionumerics.

Resumo:

Staphylococcus aureus é um importante causador de infecções hospitalares e comunitárias. Sua presença como colonizante das fossas nasais tem possibilitado sua disseminação na comunidade podendo ser encontrado inclusive em animais de estimação. O aumento de isolados de *S.aureus* resistentes à meticilina - MRSA têm dificultado a terapêutica de infecções, assim ferramentas que possibilitam a análise do modo de disseminação deste patógeno se fazem necessárias. O estudo teve como objetivo utilizar o software Bionumerics® v. 6.5 para análise da clonalidade de isolados de *S.aureus* a fim de contribuir para o entendimento da transmissibilidade deste patógeno em nosso meio. Foram recuperados de bancos de dados 170 padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de *repetitive element palindromic-polymerase chain reaction* (rep-PCR-RW3A) realizada para *S. aureus* recuperados de pacientes hospitalizados (H-SA), *S. aureus* recuperados de indivíduos da comunidade (C-SA) e *S. aureus* recuperados de animais de estimação (cães) (Pet-SA). O software Bionumerics® v.6.5 foi utilizado para análise do padrão de bandas (*fingerprint*) dos diferentes isolados. Isolados bacterianos com similaridade (coeficiente de DICE $\geq 0,8$) foram agrupados em um mesmo *cluster*. Foi observado um total de 63 *clusters* distintos entre os quais três possuíam mais de 12 representantes. Seis *clusters* possuíam tanto C-SA quanto H-SA (5/6 incluíam pet-SA sendo 1/5 pet-MRSA) A utilização do software possibilitou verificar a existência de grande variabilidade clonal entre os isolados de *S. aureus* e também revelou a existência de disseminação clonal entre isolados de animais e hospitalares, demonstrando a versatilidade deste microrganismo.

Introdução

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes de infecções tanto adquiridas em hospitais quanto na comunidade em todo o mundo. Este

patógeno oportunista coloniza a cavidade nasal dos seres humanos e possui importantes mecanismos de resistência, como alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP2) que confere resistência aos β -lactâmicos conhecidos como MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*). Inicialmente MRSA se mantinha restrito apenas a ambientes hospitalares, porém na última década observaram-se indivíduos colonizados por MRSA na comunidade (CA-MRSA) incluindo animais de estimação (pet-SA). Isolados CA-MRSA geralmente possuem menor resistência a antimicrobianos, porém maior virulência podendo produzir *Panton-Valentine* leucocidina (PVL) que quando presente causa necrose tecidual. Dessa forma, a vigilância e o controle da disseminação desse patógeno são de extrema importância. Ferramentas de bioinformática que permitem a análise de grandes bancos de dados têm sido importante aliadas na avaliação da clonalidade entre isolados de uma mesma espécie. O presente estudo teve como objetivo realizar, com auxílio do *software* Bionumerics® v.6,5, agrupamentos dos isolados MRSA em *clusters* e contribuir com o entendimento da transmissibilidade de *S. aureus* tanto no hospital Universitário de Maringá quanto na comunidade.

Materiais e métodos

Software Bionumerics® v.6,5

Esta ferramenta permite análises integradas das maiores aplicações em bioinformática, como: padrões eletroforéticos, microarray fenotípico, sequenciamentos, perfis espectrofotométricos e cromatográficos. A primeira parte do presente estudo foi conhecer mais profundamente o programa *Software Bionumerics® v.6,5* e suas ferramentas e redigir um protocolo padronizado simplificado para seu uso. Este POP foi confeccionado e uma cópia do mesmo foi disponibilizada ao setor de Biologia Molecular do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa-COMCAP onde fica o computador com o *software* (BioNumerics version 6.6 Quick Guide, 2011).

Grupo amostral

Foram estudados bancos de dados contendo 215 padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de *repetitive element palindromic – polymerase chain reaction* (rep-PCR- RW3A) realizada para *S. aureus* recuperados de pacientes hospitalizados (H-SA), *S. aureus* recuperados de indivíduos da comunidade (C-SA) e *S. aureus* recuperados de animais de estimação (cães) (Pet-SA). Apenas 170 padrões foram considerados válidos para a análise (perfil de bandas em gel de agarose superior a seis bandas). Os isolados H-SA foram provenientes projeto de vigilância epidemiológica de bactérias multirresistentes do Hospital Universitário regional de Maringá (HUM), isolados de 12/2010 a 12/2012 e identificados por métodos bioquímicos automatizados BD Phoenix™. Os isolados C-SA e Pet-SA foram provenientes do banco de dados da dissertação de mestrado de Pinto, N.B. que analisou isolados de *S.aureus* de humanos e seus cães de estimação atendidos em 25 clínicas veterinárias da cidade de Maringá-Pr, no ano de 2011 e identificados por testes bioquímicos tradicionais, características

morfotintoriais e por reação em cadeia da polimerase (PCR) Estes isolados, já caracterizados quanto a resistência a antimicrobianos, pela presença dos genes SCCmec, mecA.

Análise dos bancos de dados

Foram recuperados dos bancos de dados fotos dos perfis de bandas de DNA (*fingerprint*) após separação eletroforética em gel de agarose dos diferentes isolados de *S. aureus* Inicialmente foi realizada a marcação das bandas de DNA no *software* Paintbrush. Destes perfis, apenas os que apresentaram 6 bandas ou mais foram selecionados e submetidos a análise no *software* Bionumerics® v.6.5. Após serem inseridos em um banco de dados, foram gerados dendogramas. Os isolados bacterianos com similaridade (coeficiente de DICE $\geq 0,8$) foram agrupados em um mesmo *cluster* pelo Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) (Van Belkum et al, 2001).

Resultados e Discussão

Foram recuperados os padrões de bandas de 215 isolados de *S. aureus*, sendo: 125 H-SA e 90 C-SA (C-SA + Pet-SA) compreendendo cães e seus donos. Após análise foram descartados 45 isolados (menos que seis bandas) restando na análise 113/125 isolados hospitalares e 57/90 isolados comunitários. Dentre os isolados H-SA, 50 eram resistentes a meticilina (MRSA), enquanto apenas dois dos C-SA e um Pet-SA eram MRSA.

Um total de 63 *clusters* foi encontrado entre os 170 isolados demonstrando uma grande variabilidade genética dos isolados circulantes de *S. aureus* na nossa região. Porém a presença de três grandes *clusters* com mais de 12 representantes em cada um deles também demonstra que também houve disseminação clonal restrita aos ambientes avaliados (hospital e comunidade). Dois destes grandes *clusters* possuíam apenas isolados H-SA e o terceiro apenas isolados da comunidade, porém neste ultimo verificou-se uma disseminação entre H-SA e Pet-SA. Seis *clusters* possuíam tanto H-SA quanto C-SA (5/6 incluía pet-AS sendo 1/5 pet-MRSA) Tabela 1.

A disseminação de *S. aureus* associada aos animais de estimação tem sido cada vez mais relatada e a presença de cepas MRSA neste contexto é de extrema preocupação, pois estes animais podem ser fontes ou reservatórios de MRSA facilitando sua disseminação. A presença de MRSA comunitário e hospitalar em um mesmo *cluster* indica ainda que clones de MRSA causadores de infecções hospitalares já podem ser encontrados colonizando indivíduos da comunidade o que também é motivo de preocupação.

A bioinformática tem sido importante aliada na área médica e o *software* bionumerics tem auxiliado grandemente na vigilância e no controle de microrganismos, pois através do mesmo podemos compreender como estes microrganismos estão se disseminando.

Tabela 1. Distribuição dos representantes de cada *cluster* nos diferentes grupos avaliados.

nº de representantes p/ <i>clusters</i> (nº de <i>clusters</i>)	Representantes presentes em cada <i>cluster</i>							
	H-SA	C-SA	Pet-SA	H-SA/ C-SA	C-SA/ Pet-SA	H-SA/ Pet-SA	Pet-SA/ Pet-SA	H-SA/ C-SA/ Pet-SA
1 (30)	20	3	7					
2 (17)	12				1	2	1	
3 (4)	2	1						1
4 (3)	2							1
5 (3)	2			1				
6 (1)								1
8 (1)								1
11 (1)	1							
12 (1)	1							
15 (2)	1				1			

H-SA: isolados de *S. aureus* de origem hospitalar; C-SA: isolados de *S. aureus* de origem comunitária de humanos; Pet-SA: isolados de *S. aureus* de origem animal (cães).

Conclusão:

A compreensão e o entendimento do funcionamento do *software* bionumerics com a confecção de um protocolo de utilização possibilitou que vários grupos de pesquisa da Universidade Estadual de Maringá pudessem utilizá-lo com maior facilidade. O uso do *software* especificamente neste projeto possibilitou verificar a existência de grande variabilidade clonal entre os isolados de *S. aureus* e também revelou a existência de disseminação clonal entre isolados de animais/humanos da comunidade/pacientes hospitalizados, demonstrando que medidas de vigilância devem ser estabelecidas para o controle deste importante patógeno.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro.

Referências

BioNumerics version 6.6 Quick Guide. Applied Maths NV, Belgium, 2011. Disponível em: www.applied-maths.com

VAN BELKUN A, STRUELENS M, DE VISSER A, VERBRUCH H, TIBAYRENC M. Role of genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 14, n. 3, p. 547-560, 2001.