

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Graduação em Biotecnologia

ISABELLA DA CRUZ FRANCO

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp DA UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM UM HOSPITAL
PÚBLICO DA CIDADE DE DOURADOS/MS**

Dourados - MS
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Graduação em Biotecnologia

ISABELLA DA CRUZ FRANCO

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp DA UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM UM HOSPITAL
PÚBLICO DA CIDADE DE DOURADOS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Ciências Biológicas e Ambientais
para a obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvana
Beutinger Marchioro.

Dourados - MS
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F825p	<p>Franco, Isabella da Cruz. Perfil epidemiológico e caracterização molecular de <i>Staphylococcus spp</i> da unidade de terapia intensiva neonatal em um hospital público da cidade de Dourados/MS. / Isabella da cruz Franco. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 22f.</p> <p>Orientadora: Silvana Beutinger Marchioro. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Gram positiva . 2. Infecção hospitalar. 3. Resistência antimicrobiana. I. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

Isabella da Cruz Franco

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Staphylococcus spp. DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM
UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DE DOURADOS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, com a comissão formada por:



Profª Drª Silvana Beutinger Marchioro
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Grande Dourados



Mestre Marcelo dos Santos Barbosa
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Grande Dourados



Mestre Kamilla Felipe do Nascimento
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 30 de Agosto de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Wild Franco e Elza da Cruz Franco, que não mediram esforços para que eu concluísse minha graduação e que sempre me apoiaram e deram todo o amor e suporte necessário para que eu chegasse até aqui.

A minha irmã, Larissa da Cruz Franco, que também sempre me apoiou e me incentivou em tudo o que fiz e a minha avó Aparecida Riquetti da Cruz pelas orações.

A toda minha família, tia Rosely, tia Rut, aos meus primos Rejane, Rogério, Maria Fernanda, Vitor José, Fernando Dib, Djanira, Miguel, Maickel, Marcella, Fernando, Ana Maria e Felipe.

A toda família Siddall, Diane, Rodney, Allison, David, Meme, Marc, Luke, em Tallmadge/OH nos Estados Unidos, pelo carinho e por me apoiarem sempre mesmo à distância.

Ao meu namorado Rodrigo da Silva Melo pelo incentivo, apoio, carinho, amizade, paciência, companheirismo e compreensão.

A todos os professores da Universidade Federal da Grande Dourados/MS (UFGD) e da Kent State University/OH (KSU) que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas que sempre torceram pelo meu sucesso.

E a Cheryl Cunnagin por sempre incentivar todos ao seu redor com seu contagiante bordão “You are the BEST!”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me guiar e me dar sabedoria para que eu fizesse as escolhas certas.

A Prof^a Dr^a Silvana Beutinger Marchioro pelo ensino, paciência e oportunidade em realizar este trabalho.

A mestranda Carolina Rangel de Lima Santos que me deu suporte, conselhos e ajudou na realização e desenvolvimento deste projeto.

Ao mestre Marcelo dos Santos Barbosa pelos ensinamentos necessários para que o trabalho fosse desenvolvido e por fazer parte da banca examinadora.

A doutoranda Kamilla Felipe do Nascimento por fazer parte da banca examinadora.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS), Gleyce Souza, Júlio Queiroz, Maria Lorenza, Flora, por sempre apoiarem uns aos outros e nunca deixar que o desânimo tomasse conta.

A Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) que me proporcionou a estrutura e um corpo docente de excelência durante toda minha graduação.

Ao Programa Ciências Sem Fronteiras pela bolsa de estudo cedida para a realização do intercâmbio e concretização de mais um sonho.

A Kent State University (KSU) – Ohio/EUA pelo um ano e meio de ensino e oportunidade de crescer como pessoa e estudante de graduação em uma universidade americana.

“Sempre que você vir uma pessoa de sucesso, você sempre verá as glórias, nunca os sacrifícios que os levaram até ali.”

Vaibhav Shah

SUMÁRIO

Índice de siglas e abreviaturas.....	I
Índice de tabelas.....	II
Índice de figuras e quadros.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Visão Geral do <i>Staphylococcus</i>	2
2.2. Prevalência e epidemiologia do <i>Staphylococcus</i>	3
2.3. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (SCoN) e MRSA: mecanismos de resistência.....	6
2.4. Infecções hospitalares em Unidade de Terapia Intensiva neonatal.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivos Gerais	9
3.2. Objetivos Específicos	9
4. METODOLOGIA.....	10
4.1. Coleta e análise de amostras	10
4.2. Protocolo de extração de DNA	10
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene <i>mecA</i> e Eletroforese em gel de agarose	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
6. CONCLUSÃO.....	15
7. BIBLIOGRAFIA	16

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

bla - Gene da β -lactamase

CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido na comunidade

DNA - Ácido desoxirribonucléico

HA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido no hospital

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MLST - *Multilocus Sequence Typing*

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBP - *Penicillin Binding Protein*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE - Eletroforese de Campo Pulsado

PSMs - Moduladores solúveis em fenol

PVL - *Panton-Valentine Leukocidin*

SCC*mec* - Cassete cromossômico estafilocócico *mecA*

SCoN - *Staphylococcus coagulase negativa*

TSST1 - Toxina-1 da síndrome do choque tóxico

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Traduzida do artigo *Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features*, mostra os dados epidemiológicos e demográficos de pacientes pediátricos brasileiros com infecções sanguíneas (PEREIRA et al., 2013).....4
- Tabela 2.** Traduzida no artigo *Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features*, mostra o ranking de patógenos de infecções nosocomiais sanguíneas em pacientes pediátricos entre 16 hospitais do Brasil (PEREIRA et al., 2013).....5
- Tabela 3.** Retirada do artigo *Padrão de mudança de clones de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina na América Latina: implicações para a prática clínica na região*, mostra a distribuição dos clones de MRSA na América Latina (RODRÍGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010).....5
- Tabela 4.** Perfil de resistência das 69 amostras analisadas com relação a cada classe antimicrobiana testada no Hospital público de Dourados/MS.....14

ÍNDICE DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Gel de agarose corado com gel red demonstrando o produto de PCR com amplificação correspondente ao gene de resistência *mecA* com 583 pb de algumas amostras avaliadas. Coluna 1: marcador de peso molecular de 1000 pb; coluna 2: controle positivo de 583 pb; colunas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11: amostras que não apresentaram o gene *mecA*; colunas 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19: amostras que apresentaram o gene *mecA*; coluna 20: controle negativo.....12

Quadro 1. Identificação da presença ou ausência do gene *mecA* em amostras da Unidade de Terapia Intensiva neonatal, com distinção do tipo de cultura analisada, sexo do neonato e os tipos de microrganismos identificados.....13

Quadro 2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em relação às classes de antibióticos que cada microrganismo se encaixou de acordo com a análise dos resultados fornecidos pelo PHOENIXTM e VITEK[®] do Hospital público de Dourados/MS.....14

RESUMO

Os *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas de grande importância nas infecções hospitalares e são responsáveis por causar foliculite, endocardite, pneumonia, bacteremia, entre outras. Estas bactérias, vem tornando-se patógenos com resistência a vários antimicrobianos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) que têm sido apontados como o terceiro agente mais comum em infecções nosocomiais. Assim, o objetivo deste estudo foi compreender a epidemiologia molecular de isolados de *Staphylococcus* spp., provenientes de um hospital escola, do setor de Unidade de Terapia Intensiva neonatal, determinando suas características moleculares e o perfil de resistência antimicrobiano e, desta forma, mensurar a prevalência dos casos de infecções hospitalares. As amostras de *Staphylococcus* spp. foram coletadas de um Hospital público de Dourados/MS entre Agosto de 2016 a Agosto de 2017 e analisadas pelos sistemas automatizados Vitek[®] (BioMérieux) e Phoenix[™]. Os isolados coletados foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (2x) glicerinado e submetidos a extração de DNA, realização da técnica da PCR para a amplificação do gene *mecA* e eletroforese em gel de agarose. Os isolados do mesmo paciente, de pacientes com etnia indígena, pacientes com idade superior a 29 dias e culturas positivas com tempo de admissão inferior que 48 hs, foram critérios de exclusão para este estudo. Das 69 amostras analisadas, 49 (71%) foram identificadas contendo o gene *mecA* e 20 (29%) amostras não continham o gene em questão. O *S. epidermidis* foi a bactéria que apresentou maior prevalência (58%), seguida do *S. haemolyticus* (27,53%) e o *S. aureus* com apenas 1 amostra (1,45%). Os principais sítios de culturas foram a hemocultura com 54 (78,26%) amostras e ponta de cateter com 15 (21,73%) amostras. Quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, 27 (39,13%), 20 (28,99%) e 15 (21,74%) isolados foram resistentes a 4, 5-7 e 3 classes de antibióticos, respectivamente, o que os classificam como isolados multirresistentes. Assim, atentando-se a frequência e aumento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. resistentes em pacientes hospitalizados, o estudo traçou o perfil de resistência bacteriana e epidemiológico. Isso pode contribuir para ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por microrganismos multirresistentes, oportunizando melhor prestação de cuidados aos pacientes e promovendo o início da terapia antimicrobiana adequada.

Palavras-chave: Gram positiva, infecção hospitalar, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Staphylococcus are bacteria Gram-positive of great importance in hospital infections and they are responsible for causing folliculitis, endocarditis, pneumonia, bacteremia, among others. These bacteria have become resistant pathogens to several antimicrobials, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS), which have been identified as the third most common agent in nosocomial infections. Thus, the aim of this study was to understand the molecular epidemiology of *Staphylococcus* spp. isolates from a teaching hospital in the neonatal intensive care unit sector, determining their molecular characteristics and antimicrobial resistance profile and, therefore, to measure the prevalence of hospital infections. The *Staphylococcus* spp. samples were collected from a public hospital in Dourados/MS between August 2016 and August 2017 and analyzed by the automated systems Vitek[®] (BioMérieux) and Phoenix[™]. The collected isolates were cultured in glycerinated Brain Heart Infusion (2x) broth and submitted to DNA extraction, PCR technique for amplification of *mecA* gene and electrophoresis with agarose gel. The isolates of the same patient, from patients with indigenous ethnicity, patients older than 29 days, and positive cultures with admission time of less than 48 hours were exclusion criteria for this study. From the 69 samples analyzed, 49 (71%) were identified containing the *mecA* gene and 20 (29%) samples did not contain the gene in question. *S. epidermidis* was the most prevalent bacterium (58%), followed by *S. haemolyticus* (27.53%) and *S. aureus* with only 1 sample (1.45%). The main culture sites were blood culture with 54 (78.26%) samples and catheter tip with 15 (21.73%) samples. Regarding the antimicrobial resistance profile, 27 (39.13%), 20 (28.99%) and 15 (21.74%) isolates were resistant to 4, 5-7 and 3 classes of antibiotics, respectively, which classify them as multiresistant isolates. Thus, considering the frequency and increase of infections caused by *Staphylococcus* spp. resistant in hospitalized patients, the study traced the bacterial profile and epidemiological resistance. This may contribute to preventive actions in the control of hospital infections caused by multiresistant microorganisms, giving better care to patients and promoting the adequate antimicrobial therapy.

Keywords: Antimicrobial resistance, Gram-positive, hospital infection.

1. INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas do tipo cocos, não formadoras de esporos e catalase positiva, sendo a maioria das espécies anaeróbias facultativas (KONEMAN et al., 1997). O gênero *Staphylococcus* engloba 49 espécies, das quais a maioria são *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN), sendo a coagulase exclusivamente sintetizada pelo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudointermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus lutrae* (CROSSLEY et al., 2010; EUZÉBY, 2014; HUMAN MICROBIOME PROJECT, 2012). Estes microrganismos podem ser encontrados na pele e em membranas mucosas de mamíferos e de outros animais.

Staphylococcus são patógenos humanos versáteis e perigosos equipados com muitos fatores de virulência e são a principal causa de infecções importantes tanto na comunidade quanto nos hospitais (FATHOLAHZADEH et al., 2008). Os *Staphylococcus* são responsáveis por infecções como a foliculite, intoxicação alimentar, osteomielite, endocardite, artrite séptica, pneumonia, infecções de pele e tecido profundo, bacteremias, meningite, celulite, infecção genital e do trato urinário e doenças invasivas que ameaçam a vida (BANNERMAN et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2007). No entanto, já é bem estabelecido que as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nos hospitais tem mostrado um aumento prevalente de cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA). Eles são geralmente resistentes aos agentes antimicrobianos como os macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos e praticamente todos os β -lactâmicos disponíveis atualmente (JAPONI-NEJAD et al., 2013).

MRSA é uma ameaça tanto aos pacientes nos hospitais quanto nas infecções adquiridas na comunidade, que parecem estar aumentando tanto em adultos quanto em crianças em várias regiões. A primeira infecção por MRSA adquirida na comunidade (CAMRSA) foi documentada em crianças no fim dos anos 1990 nos Estados Unidos da América (CHUA et al., 2011). O MRSA é o principal agente infeccioso da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal (DALAPO, 2014) e os pacientes desta ala são extremamente vulneráveis a infecções devido ao seu sistema imune precário, pobre integridade da pele, longos períodos na UTI, frequente uso de aparelhos invasivos (POLIN, 2012), contato com funcionários, pais e outros pacientes e com o ambiente hospitalar. Esses eventos aos quais o neonato é exposto podem causar infecções com severa morbidade e mortalidade, assim como surtos nosocomiais (DRAMOWSKI et al., 2017).

Já os SCoN só foram apontados como importantes patógenos nas infecções nosocomiais nos anos 1970. Até aquela época eles eram considerados contaminantes simples de amostras e pouca atenção era dada. Nas últimas décadas os SCoN vem sendo descritos como importantes causadores de infecções nosocomiais e citados como o terceiro agente mais comum em infecções nosocomiais de sangue (KONEMAN et al., 1997; SHINGAL et al., 2006). Isso se deve ao avanço da medicina e suas tecnologias, diminuição da taxa de mortalidade da população mundial, números elevados de doenças debilitadoras,

neoplasias e imunodeficiência, as quais tornaram o ser humano um hospedeiro vulnerável aos SCoN (AGVALD-ÖHMAN; LUND; EDLUND, 2004; KONEMAN et al., 1997;). Em neonatos, os SCoN são as bactérias mais comumente associadas à infecções e sepse tardia, seguida pelo *S. aureus* (HORNİK, 2012). Estas bactérias, resistente a antibióticos tornaram-se endêmicas em muitas UTIs neonatais, principalmente o MRSA (NELSON et al., 2015; POPOOLA et al., 2014).

O surgimento da resistência antimicrobiana às drogas reflete um problema sério relacionado com o aumento significativo de terapias clínicas antimicrobianas em pacientes afetados por infecções, principalmente quando envolvem microrganismos com numerosos fatores de virulência e mecanismos genéticos que favorecem a aquisição de tais características no ambiente hospitalar. O reconhecimento laboratorial dessa resistência e suas implicações clínicas tem tornado-se relevante associado com o cuidado e o impacto epidemiológico (CUNHA; USTULIN, 2011).

Recomendações preventivas para evitar a transmissão e a infecção de MRSA e *Staphylococcus* em geral em UTI neonatal incluem a identificação de neonatos colonizados e a implementação de precaução de contato, higienização das mãos, e em alguns casos, a descolonização dos neonatos e/ou dos funcionários da saúde (GERBER et al., 2006). Assim, o objetivo deste estudo foi compreender a epidemiologia molecular de isolados de *Staphylococcus* spp., provenientes de um hospital escola, do setor de Unidade de Terapia Intensiva neonatal, determinando suas características moleculares, o perfil de resistência antimicrobiano e, desta forma, mensurar a prevalência dos casos de infecções hospitalares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Visão Geral dos *Staphylococcus*

Staphylococcus é o gênero de espécies de bactérias Gram-positivas, que possuem formato de cocos, em arranjos individuais, aos pares ou em grupos irregulares que lembram cachos de uvas, com diâmetro entre 0.5 a 1.5 μm , não produtores de esporos, podendo ser aeróbios ou anaeróbios facultativos e com temperatura ótima entre 30 a 37 °C. Estas bactérias são pertencentes à família Staphylococcaceae que integra a microbiota do corpo humano, presente nas fossas nasais de 20 a 30% das pessoas, normalmente sem causar doenças (PASTERMARK, 2017).

No entanto, os *Staphylococcus* podem causar infecções e a severidade da doença e procedimentos invasivos como cateteres venosos centrais, ventilação mecânica e cateterismo vesical, tempo de internação, uso de antibióticos de amplo espectro, faixa etária menor que dois anos, relação paciente-enfermeiro são alguns pontos que contribuem para um risco maior em adquirir uma infecção hospitalar para os pacientes que se encontram na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (EMORI et al., 1995). E devido ao uso de destes aparelhos invasivos, os *S. epidermidis*, por exemplo, são capazes de estabelecer uma

relação comensal longa com os seres humanos desde o início da vida, no entanto, esta relação mostra altas taxas de resistência aos antibióticos de relevância clínica (MORGENSTERN et al., 2016).

As espécies mais prevalentes de SCoN são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. lugdunensis* e o *S. aureus* é a espécie mais prevalente dos *Staphylococcus* coagulase positiva (MACHADO, 2007). Algumas espécies são produtoras de biofilme, que dá-se pelo crescimento destes microrganismos embebidos em uma camada de água e exopolissacarídeos, conhecido como slime ou muco, e são capazes de se aderirem a superfícies inertes ou em tecidos vivos (VUONG; OTTO, 2002).

2.2. Prevalência e epidemiologia dos *Staphylococcus* em recém-nascidos

É possível observar diferenças na prevalência de determinados agentes etiológicos para cada sítio de infecção, por exemplo: *S. aureus* em infecções de sítios operatórios, de corrente sanguínea relacionada a cateteres venosos centrais, de pele e de trato respiratório. Os SCoN geralmente estão associados a infecções de próteses e de corrente sanguínea relacionada a cateteres venosos centrais (ANVISA, 2005).

Bactérias do canal de parto ou contaminação secundária a bacteremias maternas são infecções precoces geralmente causadas por *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Já as infecções consideradas tardias, geralmente são decorrentes do ambiente em que o recém-nascido encontra-se internado. *S. aureus* e outras bactérias Gram-negativas são os principais agentes de infecção em grande parte dos hospitais em países da América do Sul, incluindo o Brasil. No entanto, muitos hospitais brasileiros vem sofrendo mudanças quanto ao perfil microbiológico das infecções nas UTIs neonatais, onde os SCoN são os principais agentes infecciosos (CALIL et al., 2015).

Como as infecções causadas por SCoN aumentaram, o interesse em estudar a suscetibilidade destes microrganismos aos antimicrobianos também aumentou. De acordo com Archer e Climo (1994), existe uma associação entre frequência de aumento de SCoN na etiologia de bacteremia nosocomial e a resistência desses microrganismos aos agentes antimicrobianos. As linhagens isoladas de espécimes clínicas têm se mostrado frequentemente resistentes a antibióticos comuns de uso hospitalar (LIVERMORE, 2000).

As tabelas foram retiradas de um estudo onde dados epidemiológicos e demográficos foram coletados de pacientes pediátricos com infecções sanguíneas. De 342 episódios relatados, 152 foram causados por bactérias Gram-positivas como mostra a **Tabela 1**. Já a **Tabela 2**, analisou o ranking dos patógenos mais prevalentes nas amostras, e com 21.3% do total das infecções sanguíneas nosocomiais estão os SCoN (PEREIRA et al., 2013). Um outro estudo realizado para a prevenção de infecção em UTI neonatal, mostrou que dos 3.536 pacientes admitidos na mesma, 74 tiveram culturas positivas para MRSA. Deste total, 62 neonatos adquiriram as cepas na UTI neonatal, das quais a maioria eram

cepas identificadas como USA300 (sequência do clone de *Staphylococcus* encontrado na América do Norte e Sul) (KARAHAN et al., 2008; POPOOLA et al., 2014).

Tabela 1. Traduzida do artigo *Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features*, mostra os dados epidemiológicos e demográficos de pacientes pediátricos brasileiros com infecções sanguíneas (PEREIRA et al., 2013).

Dados epidemiológicos e demográficos de pacientes pediátricos com infecções nosocomiais de corrente sanguínea	
Dados do paciente	N (%)
Total de pacientes pediátricos	342
Média de idade (\pmSD), em anos	4,7 (\pm 5,1)
Sexo	
Masculino	176 (51,5%)
Feminino	166 (48,5%)
Configuração da UTI	172 (50,4%)
Infecção monomicrobial	328 (95,9%)
Organismos (N=357)	
Gram-negativa	175 (40,9%)
Gram-positiva	152 (42,6%)
Fungo	30 (8,4%)
Condições subjacentes	
Malignidade	95 (27,8%)
Respiratório	54 (15,8%)
Gastrointestinal	36 (10,5%)
Outros	65 (19,0%)
Potenciais fatores de risco	
Cateter venoso central	227 (66,4%)
Ventilador	130 (38,0%)
Cateter urinário	76 (22,2%)
Mortalidade	74 (21,6%)

Tabela 2. Traduzida no artigo *Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features*, mostra o ranking de patógenos de infecções nosocomiais sanguíneas em pacientes pediátricos entre 16 hospitais do Brasil (PEREIRA et al., 2013).

Classificação de patógenos nosocomiais de corrente sanguínea em pacientes pediátricos entre 16 hospitais pelo Brasil.

Organismos	Nº de isolados	% de isolados	Idade < 1 anos	Idade 1-5 anos	Idade > 5 anos	(%)
<i>Staphylococci</i> coagulase negativa	76	21,3	50,0	21,1	19,0	26,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	38	10,6	18,2	11,3	9,5	21,1
Espécies de <i>Candida</i>	27	7,6	13,7	6,7	8,6	58,3
Espécies de <i>Enterococcus</i>	21	5,9	13,7	3,4	9,5	30,8
Espécies de <i>Streptococcus</i>	12	3,4	-	2,9	5,2	16,7
Espécies de Gram-negativas	148	41,4	-	50,0	38,8	150,0

A **Tabela 3**, mostra a distribuição de clones de *Staphylococcus* na América Latina, onde o Brasil se destaca por apresentar a maior variedade de clones comparado aos outros países (RODRÍGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010).

Tabela 3. Retirada do artigo *Padrão de mudança de clones de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina na América Latina: implicações para a prática clínica na região*, mostra a distribuição dos clones de MRSA na América Latina (RODRÍGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010).

Clones de MRSA circulantes na América Latina, identificados desde 2000.

Países	Clones
Brasil	NY/J, Br, H, P, C, OSPC, USA300, USA800, WA1.
Paraguai	C, Br
Uruguai	Br, U, UR6, MW2, USA600, USA800, USA1100
Argentina	C, Br, P
Chile	C, Br
Peru	Br, USA800, USA300
Equador	Br, USA300
Colômbia	C, Br, P, I, USA300
Costa Rica	USA300, USA800
México	NY/J, M
Venezuela	C, USA300
Trinidad e Tobago	CMRSA-6

Legenda: Br: Brasileiro e variantes; C: Cordobês/Chileno; CM: CMRSA-6 (Canadense); H: Húngaro; I: relacionado ao Ibérico; M: Mexicano; MW2: relacionado ao MW2; NY/J: relacionado ao Nova Iorque/Japão; OSPC: Oceania Sudeste do Pacífico; P: relacionado ao Pediátrico; U: hospital uruguaio; UR6: surto em comunidade no Uruguai; WA1: Austrália Ocidental.

2.3. *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN) e MRSA: mecanismos de resistência

Em 1928 Alexander Fleming descobriu a penicilina através de seus experimentos com *Staphylococcus aureus*. Fleming notou que uma de suas amostras havia sido contaminada com um mofo e que ao redor deste não havia crescimento de *S. aureus*. O cientista britânico começou então a pesquisar sobre o mofo, oriundo do fungo *Penicillium*, e concluiu que o mesmo secretava uma substância que destruía as bactérias. No entanto, a penicilina só foi isolada em 1938 na Inglaterra por Ernst B. Chain e Howard W. Florey, que extraíram um pó marrom do cultivo do bolor e testaram em 80 tipos de bactérias, comprovando sua eficácia. Após dois anos, em 1940, a penicilina foi utilizada pela primeira vez no homem (NOSSA CAPA, 2009). Um ano após a liberação da penicilina semi-sintética no mercado, em 1961, foi registrado o primeiro caso de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ANVISA, 2017). Após esse registro o MRSA tornou-se endêmico em muitos hospitais (SIMOR, 2001), e em meados de 1990, a oxacilina, pertencente à mesma classe de antibiótico que a meticilina, foi selecionada e utilizada para o tratamento das infecções hospitalares (CDC, 2000).

Os *Staphylococcus*, independente de serem coagulase negativa ou positiva, apresentam um alto grau de resistência aos antibióticos, principalmente a benzilpenicilina ou penicilina G. Assim, criou-se a penicilina semi-sintética que é munida de radicais que as protegem contra a ação das β -lactamases. No entanto, essas bactérias possuem uma capacidade elevada em adaptar-se a pressão seletiva dos antibióticos e tornaram-se resistentes a estas drogas também (ROBINSON; ENRIGHT, 2003). Com isso, pacientes que apresentavam cepas de SCoN resistentes a oxacilina ou meticilina passaram a apresentar quadros clínicos graves, já que as drogas utilizadas não estavam desempenhando sua função com eficácia. Isso levou pesquisadores a elucidar possíveis mecanismos de resistência para que o tratamento dessas bactérias fosse eficaz (ALCARÁZ et al., 2003).

Os mecanismos responsáveis pela resistência em SCoN são idênticos em *S. aureus*, no entanto, a resistência mediada pelo gene *mecA* é expressa em baixos níveis quando comparada com o MRSA, dificultando sua detecção (LIVERMORE, 2000). A resistência a oxacilina pode ser detectada através de técnicas fenotípicas como a DNase, E-Test e disco de difusão ou através de técnicas genotípicas como a PCR que é considerada o padrão ouro na detecção do gene *mecA* (ROSA, 2008). Os SCoN e MRSA possuem diversos mecanismos de resistência a antibióticos, os quais destacam-se os mais importantes como a

produção do gene *mecA*, PBPs (*Penicillin Binding Protein*), β -lactamase, slime (fator de virulência dos SCoN, pois permite a aderência das bactérias em superfícies lisas) (VUONG; OTTO, 2002), plasmídeos e transposons. Assim, os genes que conferem resistência são facilmente passados de uma linhagem para outra através da conjugação bacteriana (ALVES; LEMOS, 2007).

Para destruir a bactéria, muitos antibióticos se ligam às PBPs para inativá-las. Essas proteínas fazem parte da construção da parede celular dos microrganismos, e sem a mesma a bactéria não consegue manter a integridade da parede celular e morre. Enquanto as cepas estafilocócicas normalmente usam três PBPs, 1, 2 e 3, na síntese de suas paredes celulares, os *Staphylococcus* resistente à meticilina ou oxacilina (MRSA) tem uma PBP complementar, a PBP 2' ou PBP 2a. Assim, na presença do gene *mecA* a célula pode crescer e se multiplicar na presença de oxacilina e outros β -lactâmicos (LIVERMORE, 2000).

O gene *mecA* é de origem cromossômica. Este apresenta dois complexos fenotípicos, o induzível que é associado a presença do plasmídeo e contém o operon *bla* da β -lactamase e possui um locus contendo os genes *mecI* e *mecRI* que se assemelham aos genes *blaI* e *blaRI* da β -lactamase. E o constitutivo que converte o fenótipo induzível para constitutivo quando há perda ou eliminação do plasmídeo da β -lactamase (MACHADO, 2007). O gene *mec* está localizado na região do cassete cromossômico estafilocócico (SCC) e 11 tipos de SCC*mec* já foram caracterizados até agora (ITO et al., 2001). O MRSA adquirido no hospital (HA-MRSA) e o MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) são distinguíveis baseados nas suas características epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas (JENKINS et al., 2009). Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a tipagem de isolados de MRSA, como a eletroforese de campo pulsado (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST), cassete cromossômico estafilocócico *mecA* (SCC*mec*), tipagem *coa*, tipagem do gene *spa* através do sequenciamento de proteína A de estafilococos altamente polimórfica, da região hipervariável associada a *mec* (*dru*), e do gene acessório regulador (*agr*) (FATHOLAHZADEH et al., 2008; WANG et al., 2012).

A resistência a oxacilina tem sido associada com as variantes clonais do gene SCC*mec* que é composto por 5 subtipos diferentes do mesmo, variando entre 20 e 68 kb (APPELBAUM, 2007). As cepas HA-MRSA geralmente possuem o SCC*mec* subtipo II, enquanto que as cepas CA-MRSA apresentam o SCC*mec* subtipo IV (WEBER, 2005). Outra característica molecular para distinguir CA-MRSA de HA-MRSA é a presença do gene *pvl* em cepas CA-MRSA (VANDENESCH et al., 2003; WEBER, 2005). A toxina *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) não é a única produzida pelo MRSA, já que diferentes cepas possuem uma ampla produção de diferentes toxinas como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST1), enterotoxina B ou C estafilocócica, α -hemolisina e os moduladores solúveis em fenol (PSMs) (MAEDA et al., 2016).

O sistema regulador *agr* é o responsável pela expressão de diversas toxinas, como a α -hemolisina e PSMs, que estão mais presentes em CA-MRSA. Os genes que expressam a produção de toxinas são mais comuns em CA-MRSA do que em HA-MRSA e as cepas

adquiridas na comunidade tendem a ser mais virulentas do que as cepas adquiridas em hospital (DIEP; OTTO, 2008). Nos pacientes que apresentam bacteremia por MRSA, a presença de genes que codificam a TSST1 e a enterotoxina estafilocócica estão associados com um risco crescente de mortalidade (MAEDA et al., 2016).

A detecção de resistência a oxacilina em *Staphylococcus* é importante para guiar a terapia e prevenir que os pacientes sejam tratados com vancomicina sem necessidade, que é um antimicrobiano que possui complicações terapêuticas e pode levar a seleção de cepas resistentes (MARSHAL et al., 1998).

2.4. Infecções hospitalares em Unidade de Terapia Intensiva neonatal

Segundo a ANVISA, o conceito de infecção hospitalar dá-se por uma infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital, a qual manifesta-se durante a internação ou após a alta e pode estar relacionada com procedimentos hospitalares ou com a internação. No Brasil, considera-se contaminação a presença de microrganismos transitórios em superfície sem a invasão do tecido ou relação de parasitismo. Já a infecção, é decorrente da invasão, multiplicação e ação dos agentes infecciosos e seus produtos tóxicos no hospedeiro, havendo interação imunológica. E a colonização é o crescimento e multiplicação de um microrganismo em superfícies epiteliais do hospedeiro, sem a presença de expressão clínica ou imunológica (ANVISA, 2005).

No entanto, para que ocorra a transmissão da infecção no ambiente hospitalar são necessários três elementos, as fontes de infecções que podem ser os pacientes, funcionários e os visitantes (ocorre com baixa frequência). Os hospedeiros susceptíveis que são principalmente pacientes imunossuprimidos como recém-nascidos, imunodeficientes ou pacientes em quimioterapia, e os meios de transmissão que podem ser de amplo espectro como o contato, as gotículas, a transmissão aérea, os vetores e veículo comum (água, alimentos, medicamentos ou equipamentos) (CALIL et al., 2015).

As ações preventivas devem ser baseadas no agente transmissor, no entanto, existem itens padrões que devem ser seguidos como a higienização da mãos (uso de solução alcoólica 70%), uso de luvas, acomodações dos pacientes (prevenção de transmissão por contato), transporte (barreira apropriada para cada paciente), máscara e proteção ocular ou facial, aventais, sapatos e propés (proteções do profissional da saúde), equipamentos e artigos (materiais perfurocortantes descartados adequadamente), roupas com lavagem adequada para a descontaminação, pratos, talheres e copos (calor e detergente são eficazes na descontaminação) e a limpeza de rotina e terminal (realizada nos equipamentos) (CDC, 2002; GARNER, 1996). Independentemente dos fatores de risco do paciente ou da doença, as precauções padrões (evitar contato com fluidos corporais em geral) são recomendadas para serem usadas com todos os pacientes pelos profissionais da saúde (APECIH, 2001).

Recém-nascidos que recebem cuidados na UTI neonatal correm um risco maior de terem infecções nosocomiais por apresentarem um sistema imune precário e devido a vários exames invasivos e procedimentos terapêuticos (MANZONI et al., 2013). Alguns estudos têm mostrado que as taxas de infecções nosocomiais em UTIs neonatais variam de 8.7% a 74.3% (ABDEL-WAHAB et al., 2013; CURA et al., 2016; URZEDO et al., 2014). Assim, as infecções no período neonatal podem ser classificadas como infecções precoces, cuja manifestação clínica ocorre até 48 horas, ou infecções tardias, cuja manifestação clínica ocorre acima de 48 ou 72 horas (ANVISA, 2005). Na UTI pediátrica as principais infecções observadas são as de corrente sanguínea e as pneumonias, enquanto que na UTI de pacientes adultos a infecção mais comum observada é a do trato urinário (EMORI et al., 1995).

Nos Estados Unidos, a incidência de infecções em UTI neonatal, por estafilos resistentes, aumentaram mais de 300% de 1995 até 2004 (LESSA et al., 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 1 milhão de mortes de neonatos anualmente é devido à infecções severas e a maioria é causada por sepse ou pneumonia (QAZI; STOLL, 2009). A taxa de incidência de sepse neonatal varia entre 1 e 5 casos por mil nascimentos em países desenvolvidos, mas esta taxa aumenta em países em desenvolvimento, variando entre 49 e 170 casos por mil nascimentos (THAVER; ZAIDI, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Caracterizar o perfil epidemiológico e molecular de *Staphylococcus* spp. da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal em um Hospital público da cidade de Dourados/MS.

3.2. Objetivos Específicos

Identificar o gene *mecA* relacionado à resistência antimicrobiana a meticilina;

Analisar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp. de um Hospital público da cidade de Dourados/MS.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e análise de amostras

As amostras provenientes de hemocultura e ponta de cateter, foram coletadas em um Hospital público na cidade de Dourados/MS entre Agosto de 2016 à Agosto de 2017 e plaqueadas em meio Ágar Sangue por 24 hs a 37 °C e acondicionadas em geladeira a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram analisadas pelo Vitek[®] (BioMérieux) sistema automatizado responsável por realizar a identificação das espécies bacterianas e pelo Phoenix[™] responsável por realizar a identificação e susceptibilidade aos antibióticos. As mesmas foram coletadas e levadas para o Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS) na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). No LPCS as amostras coletadas foram repicadas em criotubos contendo 2 mL de caldo Brain Heart Infusion 2x (BHI) glicerinado e colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse período as amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C para posterior uso e análises. Como critério de inclusão, utilizou-se somente amostras que apresentaram perfil de resistência a oxacilina. Foi utilizado como critério de exclusão as amostras do mesmo paciente, amostras indígenas, amostras de pacientes com idade superior a 29 dias e casos de culturas positivas com internação inferior a 48 horas de admissão.

4.2. Protocolo de Extração de DNA

Para a extração de DNA, a metodologia foi baseada no protocolo de Sambrook et al. (2012), com algumas adaptações. Foram utilizados 1.5 mL da cultura e centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. Em seguida o pelete foi ressuspendido em 600 µl de T.E 1x e foram adicionados 30 µl de SDS a 20% e 3 µl de proteinase K a 2 mg/mL. As amostras foram incubadas em estufa por 2 horas a 37 °C sem agitação. Após esse período, 500 µl de fenol clorofórmio foram adicionados e as amostras foram passadas no vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Houve a formação de duas fases, da qual foram coletados 500 µl da fase superior e transferidos para um novo tubo de 1.5 mL. Foram adicionados 10 µl de NaCl a 5 M, 1 mL de etanol absoluto gelado para a precipitação e incubados a -20 °C por 2 horas. Após a incubação as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de álcool 70% foi usado para precipitar cada amostra, as quais foram submetidas à uma nova centrifugação de 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 µl de T.E 1x para ressuspender o DNA. Finalizada a extração de DNA, cada amostra teve seu DNA quantificado e qualificado pelo BioDrop[®].

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *mecA* e Eletroforese em gel de agarose

As reações da PCR para a detecção do gene *mecA* foram realizadas conforme os parâmetros e primers descritos por Azimian et al. (2012) (os primers utilizados neste estudo foram sintetizados pela empresa Sigma), com modificações: 2.5 µl de tampão [1x], 1.25 µl de cada primer [0.5 µM], 0.5 de DNTP [200 µM], 1.25 µl de MgCl₂ [2.5 mM], 0.25 µl de Taq [0.1 U/ µl], 14.0 µl de água estéril e 4.0 µl de DNA, totalizando uma reação final de 25 µl. As condições utilizadas para a realização da PCR foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Para o preparo do gel de agarose foram utilizados 90 mL de TBE 0.5x e 1.35 g de agarose. Foram aplicados em cada poço do gel 2 µl do DNA amplificado através da técnica de PCR, 2 µl de tampão de corrida e 2 µl de GelRed. A corrida foi realizada a 80 V por 110 minutos e o gel foi visualizado no fotodocumentador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração de DNA, realização da PCR e da eletroforese em gel de agarose para identificação do gene *mecA*, foi possível concluir que do total de 69 amostras, 49 foram positivas para a presença do gene *mecA* e 20 (29%) não apresentaram o gene em questão (**Figura 1**), ou seja, 71% dos isolados possuem resistência a algum antimicrobiano testado. Esta aquisição da resistência pode ser explicada pela pressão seletiva causada pelo uso, muitas vezes inadequado, de antibióticos de amplo espectro, como mencionou Bannerman et al. (2003) em seu estudo com *Staphylococcus*.

Segundo Pereira et al. (2014), a presença do gene *mecA* foi identificada em 21 (17.6%) amostras, de um total de 119 amostras, da UTI neonatal também utilizando a técnica da PCR. Shoja et al. (2009), também identificou a presença do gene *mecA* em seu estudo com prevalência de 89%, enquanto que este estudo observou uma prevalência de 71% das amostras contendo o gene *mecA*. A escolha do gene *mecA* para este estudo fundamentou-se em artigos que trazem o mesmo como um excelente marcador molecular na identificação de resistência a classe das penicilinas.

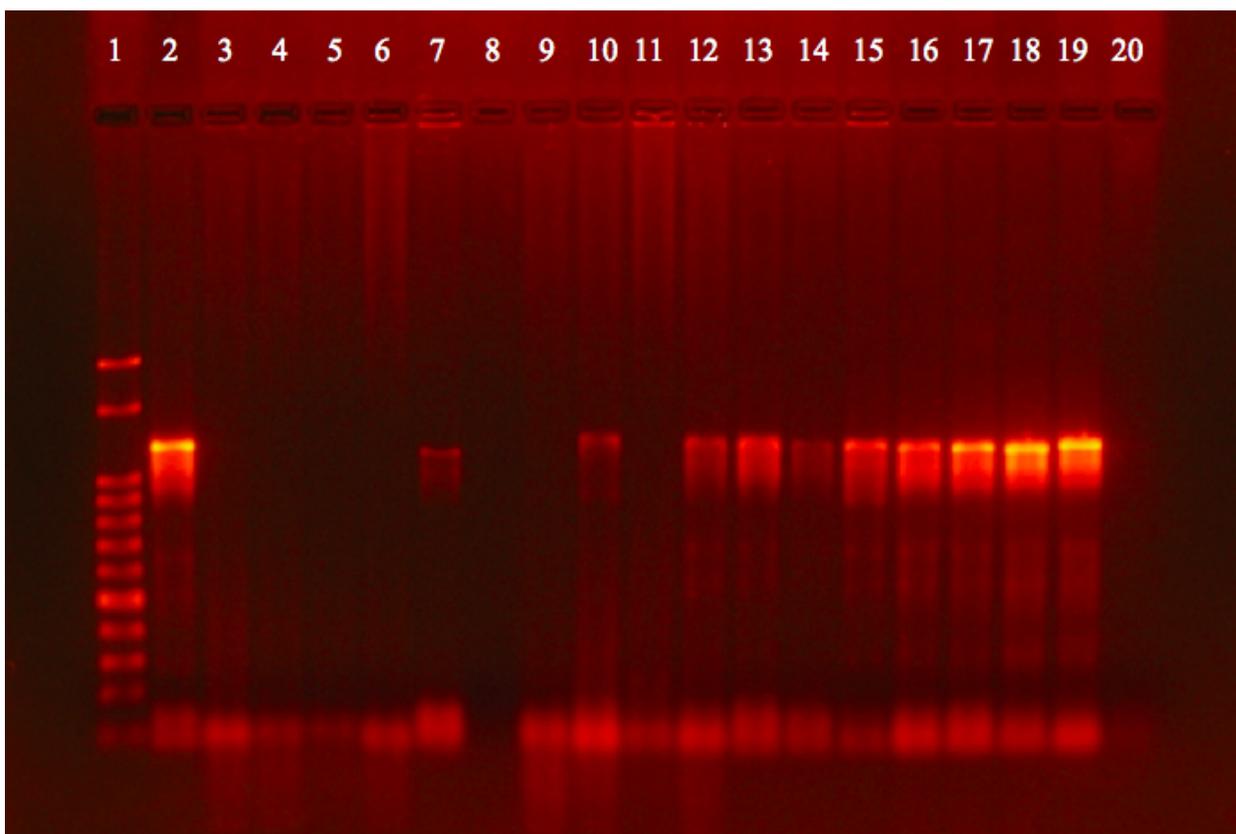


Figura 1. Gel de agarose corado com GelRed demonstrando o produto de PCR com amplificação correspondente ao gene de resistência *mecA* com 583 pb de algumas amostras avaliadas. Coluna 1: marcador de peso molecular de 1000 pb; coluna 2: controle positivo de 583 pb; colunas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11: amostras que não apresentaram o gene *mecA*; colunas 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19: amostras que apresentaram o gene *mecA*; coluna 20: controle negativo.

Durante o período avaliado, foram isoladas 69 amostras bacterianas, 40 (58%) do sexo masculino e 29 (42%) do sexo feminino, destas as mais prevalentes foram *S. epidermidis* 40 (57,97%), *S. haemolyticus* 19 (27,53%), *S. saprophyticus* 4 (5,80%), *S. capitis* 2 (2,90%) e *S. aureus*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. chromogenes*, cada um com apenas 1 (1,45%) amostra (**Quadro 1**). O *S. epidermidis* foi o isolado mais frequente de amostras sanguíneas deste estudo. Ertugrul et al. (2016), analisou 126 amostras sanguíneas, provenientes da UTI neonatal e concluiu que 20,7% eram infecções causadas por *S. epidermidis*, sendo estes os microrganismos mais prevalentes de seu estudo. Auriti et al. (2003), relatou que os microrganismos isolados com maior frequência na UTI neonatal foram os SCoN com 25% de incidência. Já este estudo, detectou que a presença de SCoN (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. chromogenes*) (MACHADO, 2007; SINGHAL et al., 2006) foi de aproximadamente 98,55% (68 amostras), onde o *S. epidermidis* foi o mais prevalente, com 57,97%, enquanto

que o *S. aureus* foi de apenas 1,45% (1 amostra) do total de amostras analisadas. No entanto, Zhou et al. (2016), relatou que de 64 amostras sanguíneas, provenientes de neonatos, 24 (37,5%) eram *S. aureus* e apenas 6 (9,4%) eram *S. epidermidis*.

Os principais sítios de culturas foram hemocultura 54 amostras (78,26%) e ponta de cateter 15 amostras (21,73%). Ertugrul et al. (2016); Reichert et al. (2016); Zhou et al (2016), utilizaram como principal sítio de cultura a hemocultura, pois através dos procedimentos invasivos que o neonato é submetido, os microrganismos que colonizam a pele, como os *Staphylococcus*, podem ir para a corrente sanguínea. Uma outra maneira dos pacientes que são submetidos a procedimentos invasivos adquirirem uma infecção é através da formação de biofilme nos cateteres pelos *Staphylococcus*, sendo o *S. epidermidis* o microrganismo mais encontrado em biofilmes (VUONG; OTTO, 2002).

Quadro 1. Identificação da presença ou ausência do gene *mecA* em amostras da Unidade de Terapia Intensiva neonatal, com distinção do tipo de cultura analisada, sexo do neonato e os tipos de microrganismos identificados.

	Tipo de Cultura		Sexo		Microrganismos (<i>Staphylococcus</i>)							
	H	C	M	F	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. chromogenes</i>
Mec+	36	13	30	19	32	12	2	1	1	-	1	-
Mec -	18	2	10	10	8	7	2	1	-	1	-	1
Total	69											

H: hemocultura; C: ponta de cateter.

Com relação ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos os testes foram feitos para as seguintes classes, penicilinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, oxazolidinonas, lincosaminas, sulfonamidas, tetraciclina, glicopeptídeos, lipopeptídeos cíclicos, ansamicinas e estreptograminas, onde pode-se observar que a maior prevalência de resistência bacteriana foi entre 4 classes de antimicrobianos (penicilinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e sulfonamidas) com 27 amostras (39,13%), seguido de 5 a 8 classes com 20 amostras (28,99%), 3 classes com 15 amostras (21,74%), 1 classe com 5 amostras (7,24%) e 2 classes com 2 amostras (2,90%) (**Tabela 4 e Quadro 2**). A partir dos resultados obtidos quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, cada antibiótico foi classificado em sua respectiva classe, segundo a ANVISA. As classes de antimicrobianos, descritas no texto

abaixo, foram contadas e separadas com relação ao perfil de resistência 1, 2, 3, 4 e de 5 a 8, com resistência a 1, 2, 3, 4 ou de 5 a 8 classes de antimicrobianos, respectivamente (**Quadro 2**).

Tabela 4. Perfil de resistência das 69 amostras analisadas com relação a cada classe antimicrobiana testada no Hospital público de Dourados/MS.

Classes dos antimicrobianos	Nº de amostras (%)
Penicilinas	69 (100%)
Aminoglicosídeos	49 (71,0%)
Macrolídeos	48 (69,56%)
Sulfonamidas	48 (69,56%)
Lincosaminas	27 (39,13%)
Ansamidas	16 (23,18%)
Tetraciclinas	8 (11,59%)
Estreptograminas	1 (1,45%)

Quadro 2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em relação às classes de antibióticos que cada microrganismo se encaixou de acordo com a análise dos resultados fornecidos pelo PHOENIX™ e VITEK® do Hospital público de Dourados/MS.

Classes	1	2	3	4	5-8
Nº de amostras	5	2	15	27	20
% de amostras	7,24%	2,90%	21,74%	39,13%	28,99%

Classe 1: resistência a um único antimicrobiano; classe 2: resistência a dois antimicrobianos; classe 3: resistência a três antimicrobianos; classe 4: resistência a quatro antimicrobianos e classe de 5-7: resistência de cinco a sete antimicrobianos.

A classe das penicilinas compõe a penicilina, metilpenicilina, oxacilina e ampicilina; aminoglicosídeos compõe a gentamicina e estreptomicina; macrolídeos compõe a eritromicina e azitromicina; oxazolidinonas compõe a linezolida; lincosaminas compõe a clindamicina; sulfonamidas compõe o sulfametoxazol e sulfadiazina; tetraciclinas compõe a tetraciclina e minociclina; glicopeptídeos compõe a vancomicina e teicoplanina; lipopeptídeos cíclicos compõe a daptomicina; ansamidas compõe a rifampicina; e estreptograminas compõe a quinupristin/dalfopristin (ANVISA, 2017).

Um total de 62 (89,85%) amostras, possuem resistência a pelo menos 3 classes de antimicrobianos (penicilinas, aminoglicosídeos, sulfonamidas ou macrolídeos), o que os

tornam isolados multirresistentes. Segundo Falagas et al. (2006), o conceito de bactérias multirresistentes dá-se pelo fato das bactérias apresentarem resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos quando submetidas aos testes de resistência *in vitro*. Para elucidar os mecanismos de resistências adotados pelos isolados analisadas neste estudos, outras análises devem ser conduzidas. Além da resistência conferida pelo gene *mecA*, os *Staphylococcus* podem apresentar resistência do tipo *bordeline*, onde as Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) de oxacilina encontram-se próximas ao ponto de corte. Isto pode ser devido a hiperprodução de β -lactamase ou modificações nas proteínas de ligação de penicilina (PBPs 1, 2 e 4); ou resistência aos glicopeptídeos devido a um espessamento da parede celular bacteriana, mas este é um mecanismo que ainda não está claro (ANVISA, 2017).

6. CONCLUSÃO

Ainda há poucos relatos sobre infecções hospitalares, em UTI neonatal, causadas pelos *Staphylococcus* spp. no Brasil, o que se faz necessário o estudo de prevalência e epidemiologia para este setor em específico. Assim, atentando-se a frequência e aumento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. resistentes em pacientes hospitalizados, o estudo traçou o perfil de resistência bacteriana e epidemiológico. Isso pode contribuir para ações preventivas no controle de infecções hospitalares provocadas por microrganismos multirresistentes, oportunizando melhor prestação de cuidados aos pacientes e promovendo o início da terapia antimicrobiana adequada.

7. BIBLIOGRAFIA

ABDEL-WAHAB, F. et al. Nosocomial infection surveillance in an Egyptian neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v.83, p. 196-199, 2013.

AGVALD-ÖHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. **Critical Care**, 8: p. 42-47, 2004.

ALCARÁZ, et al. Species identification, slime production and oxacilin susceptibility in coagulase-negative Staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, 2003.

ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos da *Staphylococcus spp.* **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.74, n.3 p. 2007-2013, 2007.

ANVISA. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar.** - Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

ANVISA. Antimicrobianos- bases teóricas e uso clínico., 2017. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em 22 ago. 2017.

APECIH- ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. Precauções: **Isolamento e Saúde Ocupacional em Neonatologia. Diagnóstico e prevenção de infecção hospitalar em neonatologia.** São Paulo, p. 81-87, 2001.

APPELBAUM, P. C. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v.45 suppl 3: p. 165–70, 2007.

ARCHER, G.L.; CLIMO M.W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v38, p.2231-2237, 1994.

AURITI, C. et al. Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. **Journal of Hospital Infections.**, v. 53, p.25-30, 2003.

AZIMIAN A. et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50(11): p. 3581-3585, 2012.

BANNERMAN, T.L. et al. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. **Clinical Microbiology American Society Microbiology**, p. 384-404, 2003.

CALIL, R. et al. Manual da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Universidade Estadual de Campinas, 2015. Disponível em <http://www.caism.unicamp.br/PDF/Manual_Controlo_Infeccao_Hospitalar_CCIH_2015.pdf> Acesso em 15 ago. 2017.

CDC. Centers of Diseases Control and Prevention. Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.48(51-52): p. 1167-71, 2000.

CDC- Centers of Diseases Control and Prevention. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA/Hand Hygiene Task Force, 2002. <<http://www.cdc.gov/handhygiene>>. Acesso em 21 ago. 2017.

CHUA, K. et al. Not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)- A clinician's guide to community MRSA-its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. **Clinical Infectious Diseases.**, v.52 (1), p. 99-114, 2011.

CONCEIÇÃO, T. et al. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. **Clinical Microbiology and Infection.**, v.13, p.971-979, 2007.

CROSSLEY, K.B. et al. Staphylococci in human disease. ***Staphylococcus aureus Bacteremia and Endocarditis***. Wiley-Blackwell, 2nd ed. p.333-345, 2010.

CUNHA, M.L.R.S.; USTULIN, D. R. **Antimicrobial resistance in *Staphylococcus spp.*** UNESP, Department of Microbiology and Immunology, Bioscience Institute, Univ. Estadual Paulista, Botucatu. A. Méndez-Vilas p. 714-721, 2011.

CURA, C. et al. Health care-associated infection surveillance in a tertiary neonatal intensive care unit: a prospective clinical study after moving to a new building. **American Journal of Infection Control**, v.44, p. 80-84, 2016.

DALAPO, O., DHANIREDDY, R., TALATI, A. J. Trends of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit from 2000-2009. **BioMed Central Pediatrics.**, v.14:121, 2014.

DIEP, B. A., OTTO, M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 361-369, 2008.

DRAMOWSKI, A. et al. Infectious disease exposures and outbreaks at a South African neonatal unit with review of neonatal outbreak epidemiology in Africa. **International Journal of Infectious Diseases**, v.57, p. 79-85, 2017.

EMORI, T. G. et al. National nosocomial surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. **American Journal of Infection Control.**, v. 19, p. 19-35, 1995.

ERTUGRUL, S. et al. Risk Factors for Health Care-Associated Bloodstream Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. **Iranian Journal of Pediatrics.**, v.26 (5): e5213., 2016.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus***, 2014.

FALAGAS, M.E.; KOLETZI, P.K.; BLIZIOTIS, I.A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, P. 1619–1629, 2006.

FATHOLAHZADEH, B. et al. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec) Analysis and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in Tehran, Iran. **Microbial Drug Resistance**, v.14(3): p.217-220, 2008.

GARNER, J. S. Guideline for Isolation Precautions in Hospitals. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.17, P.53-80, 1996.

GERBER, Susan I, et al. Management of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the neonatal intensive care unit: a consensus statement. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.27 (2): p. 139–145, 2006.

HORNIK, C. P. et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. **Early human development**, 88 (Suppl 2): p. 69–74, 2012.

HUMAN MICROBIOME PROJECT, C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature.**, v.486(7402): p. 207-214, 2012.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n. 5 p. 1323-1336, 2001.

JAPONI-NEJAD, A. et al. Molecular characterization of the first community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Central Iran. **International Journal of Infectious Diseases**, v.17, p. 949-954, 2013.

JENKINS, T. C. et al. Epidemiology of healthcare-associated bloodstream infection caused by USA300 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 3 affiliated hospitals. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.30, p. 233-241, 2009.

KARAHAN, Z. C. et al. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. **Microbial Drug Resistance**, v.14, p. 203-210, 2008.

KONEMAN, E.W. et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. **Philadelphia: Lippincott**, 5th ed., p. 559, 1997.

LESSA, F.C. et al. Trends in incidence of late-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in neonatal intensive care units: data from the National Nosocomial Infections Surveillance System, 1995-2004. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, p. 577-581, 2009.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, v.16, p.3-10, 2000.

MACHADO, A.B.M.P. **Resistência à meticilina mediada pelo gene mecA nos Staphylococcus spp coagulase negativa.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado, Rio Grande do Sul, 2007.

MAEDA, M. et al. Analysis of staphylococcal toxins and clinical outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39:1 p. 195–200, 2016.

MANZONI, P. et al. Prevention of nosocomial infections in neonatal intensive care units. **American Journal of Perinatology**, v.30, p. 81-88, 2013.

MARSHAL, S.A., et al. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bloodstream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.30, p. 205-214, 1998.

MORGENSTERN, M. et al. Antibiotic Resistance of Commensal *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in an International Cohort of Surgeons: A Prospective Point-Prevalence Study. **PLoS One**, v.11(2), 2016.

NELSON, M.U. et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Neonatal Intensive Care Unit in the Decade following Implementation of an Active Detection and Isolation Program. **Journal of Clinical Microbiology**, 53: p. 2492–2501, 2015.

NOSSA CAPA: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.45, n.5, p.I, Oct. 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000500001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 ago. 2017.

PASTERMARK, J. O que é *Staphylococcus aureus*? Hospital Albert Einstein-Sociedade Beneficente Israelita Brasileira, 2017. Disponível em <<https://www.einstein.br/noticias/noticia/o-que-staphylococcus-aureus>> Acesso em 18 ago. 2017.

PEREIRA, C.A.P, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. **PLoS ONE**, 8 (7): e 68144, 2013.

PEREIRA, V.C.; RIBOLI, D.F.M.; CUNHA, M.L.R.S. Characterization of the clonal profile of MRSA isolated in neonatal and pediatric intensive care units of a University Hospital. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13:50, 2014.

POLIN, R.A.; DENSON, S.; BRADY, M.T. Epidemiology and diagnosis of healthcare-associated infections in the NICU. Committee on Fetus and Newborn, Committee on Infectious Diseases. **Paediatrics**, v.129. p. 1104-1109, 2012.

POPOOLA, V.O, et al. MRSA Transmission and Infections in a Neonatal Intensive Care Unit Despite Active Surveillance Cultures and Decolonization – Challenges for

Infection Prevention. **Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America**, 35 (4): p. 412-418, 2014.

QAZI, S.A.; STOLL, B.J. Neonatal sepsis: a major global public health challenge. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28:S1–S2, 2009.

REICHERT, F. et al. Pathogen-Specific Clustering of Nosocomial Blood Stream Infections in Very Preterm Infants. **Pediatrics.**, v.137, 2016.

ROBINSON, D., ENRIGHT, M.A.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **American Society for Microbiology**, v. 47, n. 12, 2003.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., SEAS, C. Padrão de mudança de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina na América Latina: implicações para a prática clínica na região. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, supl.2, 2010.

ROSA, J. O. **Detecção de gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes a oxacilina isolados da saliva de profissionais da saúde de um Hospital Universitário**. Universidade Federal de Goiás. Dissertação de mestrado, Goiânia, 2008.

SAMBROOK, J., GREEN, M. R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012.

SHOJA, S. et al. Study of MRSS isolated from blood culture. **Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences**, v.31, p. 39-44, 2009.

SIMOR, A. E. Containing methicillin-resistant *S aureus*. Surveillance, control, and treatment methods. **Postgrad Medicine Journal**, v. 10(4):43-8, 2001.

SINGHAL, R. et al. Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative Staphylococci in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, p. 569-570, 2006.

THAVER, D.; ZAIDI, A.K. Burden of neonatal infections in developing countries: A review of evidence from community-based studies. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.28:S3–S9, 2009.

URZEDO, J. E. et al. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit during 16 years: 1997–2012. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, p. 321-326, 2014.

VANDENESCH, F. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p. 978–84, 2003.

VUONG, C., OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481-489, 2002.

WANG, W-Y. et al. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan. **PLoS One**, v.7(1), 2012.

WEBER, J.T. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41 suppl 4: p. 269–72 2005.

ZHOU, B. et al. Clinical and microbiological profile of babies born with risk of neonatal sepsis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12(6), p. 3621-3625, 2016.