MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Yves Mauro Fernandes Ternes

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA (SCoN) ISOLADOS DA CAVIDADE NASAL DE NEONATOS INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE TRATAMENTO INTENSIVO DE GOIÂNIA

Orientador:

Prof. Dr. André Kipnis

Co-orientadora:

Profª. Drª. Ana Lúcia S. S. de Andrade

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GOIÂNIA-GO, 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Yves Mauro Fernandes Ternes

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA (SCoN) ISOLADOS DA CAVIDADE NASAL DE NEONATOS INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE TRATAMENTO INTENSIVO DE GOIÂNIA

Orientador:

Prof. Dr. André Kipnis

Co-orientadora:

Profª. Drª. Ana Lúcia S. S. de Andrade

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical, área de concentração Microbiologia. Este trabalho foi realizado com o auxílio Financeiro do Conselho Nacional para Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

GOIÂNIA-GO, 2010

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[x] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Yves Mauro Fernandes Ternes				
CPF:	95315047172	E-mail:	yvesmauro@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [x]Sim [ ] Não					
Vínculo Empregatício do autor					
Agência de fomento:	CNPq			Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:		CNPJ:	
Título:	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVA (SCoN) ISOLADOS DA CAVIDADE NASAL DE NEONATOS INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE TRATAMENTO INTENSIVO DE GOIÂNIA				
Palavras-chave:	*Staphylococcus* coagulase negativa, *mec*A, vigilância neonatal.				
Título em outra língua:	MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF COAGULASE NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* (CoNS) ISOLATED FROM THE NASAL CAVITY OF NEONATES ADMITTED TO AN INTENSIVE CARE UNIT OF GOIÂNIA				
Palavras-chave em outra língua:	coagulase negative *Staphylococcus*, *mec*A, neonatal surveillance.				
Área de concentração:	Microbiologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	15/03/2010				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical				
Orientador(a):	André Kipnis				
CPF:	075.965.498.02	E-mail:	akipnis@iptsp.ufg.br		
Co-orientador(a):	Ana Lúcia S. S. de Andrade				
CPF:	235.715.191.91	E-mail:	ana@iptsp.ufg.br		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] [x] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

Dedicatória

Primeiramente ao meu orientador, profº Dr. André Kipnis, que soube me passar com sabedoria todos os ensinamentos necessários. Que mesmo em algumas situações ausentes, foi extremamente atencioso em minhas solicitações e, principalmente, por ter acreditado em meu trabalho, desde o primeiro momento. Pessoa que admiro pela ética e profissionalismo.

À profª Dr. Ana Lúcia Andrade, minha co-orientadora responsável pelo projeto VIGIA-CRIANÇA, pelos constantes ensinamentos epidemiológicos, na interpretação dos dados clínicos. Um exemplo de competência na área epidemiológica nacional e internacional.

Aos membros da banca de qualificação, profs Geraldo Sadoyama, Regina Bringel e Anaclara Tipple, pelos excelentes conselhos e sugestões que foram extremamente essenciais na melhoria deste trabalho.

À toda equipe do VIGIA-CRIANÇA. Coletadores, auxiliares de campo, digitadores do banco de dados, transporte enfim, a todos aqueles que fizeram parte deste grande projeto, e que sem eles nada disso seria possível.

À Maria Aparecida (Cida), Ruth Minamisava e Vicente Pessoa, pelo grande auxílio na construção do banco de dados, com suas experiências na área clínica e epidemiológica, que me fizeram crescer muito.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e companheiras de pós Alessandra Marques, Camila Xavier, Lorena Cristina, Sueli Lemes e Hesther Bousquet, representando todos estagiários do laboratório, pelo apoio diário no laboratório, que foi muito importante nesta jornada de dois anos.

Ao amigo Thalles Américo, que foi essencial na fase final deste trabalho, me auxiliando no Laboratório de Microbiologia.

Às grandes amigas Drªs. Maria Cláudia e Juliana Lamaro, pelo companheirismo na fase de coleta de swabs, pelo aprendizado diário, tanto profissional quanto pessoal. Sem vocês esta caminhada seria bem mais trabalhosa.

À Liana Jayme e profs Lara Stefania e Lúcia Kioko, pessoas que também me deram grande apoio nestes anos, além de compartilhar experiências e conhecimento prático.

Aos meus familiares, em especial meus pais, que sem eles nada disso seria possível. Vocês são meu espelho, minha fonte de energia diária para realização desta caminhada. Muito obrigado por tudo, de coração!

À pessoa que compartilhou todas minhas dificuldades, porém sempre me dando forças para continuar, minha noiva Fabrícia A. Tôrres.

A todos os amigos, em especial Rogério Fraga e Cláudio Braz, que sempre me incentivaram nesta caminhada com conselhos e o mais importante, a amizade!

Ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical, por ter me recebido e propiciado este curso.

Ao CNPq e Funape, pelo incentivo financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado a todos!!!

"*Você ganha forças, coragem e confiança a cada experiência em que você enfrenta o medo. Você tem que fazer exatamente aquilo que acha que não consegue. Você precisa fazer aquilo que não é capaz de fazer*." (Eleanor Roosevelt)

"*A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original."* (Albert Einstein)

Sumário

Resumo.....ix

Abstract.....x

1. Introdução.....1

1.1 Apresentação 1

1.2. Agente etiológico.....3

1.2.1.Identificação.....3

1.3. Resistência aos antimicrobianos..... 5

1.3.1. Introdução de agentes antibacterianos.....5

1.3.2. Terapia das infecções estafilocócicas.....6

1.4. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da epidemiologia molecular de *Staphylococcus* sp 8

1.5. Infecções nosocomiais 12

1.6. Justificativa.....16

2. Objetivos 18

3. Material e Métodos 19

3.1. População de estudo e coleta 19

3.2. Isolamento.....20

3.3. Provas de identificação microbiana.....20

3.4. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. 21

3.5. Tipagem molecular.....23

3.5.1. Extração de DNA.....23

3.5.2. PCR – m*ec*A **23**

3.5.3. ITS – PCR **24**

3.5.4. Identificação do cassette cromossomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*) **25**

3.5.5. *Pulsed field gel electrophoresis* – PFGE **26**

4. Resultados **27**

5. Discussão **36**

6. Conclusão **43**

7. Referências Bibliográficas **44**

Anexo 1

Anexo 2

Anexo 3

Resumo

A colonização nasal por *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) tem sido descrito como um fator de risco para infecção sistêmicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a colonização por SCoN no momento da admissão e alta de neonatos hospitalizados em uma unidade de tratamento intensivo (UTI) neonatal de referência em Goiânia, Brasil. Todos os neonatos admitidos na UTI entre julho/2007 e maio/2008 foram elegíveis. Swabs nasais foram coletados na admissão e alta. As amostras foram isoladas em agar manitol, TSA e TSB, ambos com 5µg/mL de oxacilina e NaCl (5%). Testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de disco difusão de acordo com CLSI 2005. A identificação das espécies foi realizada pelo método da ITS-PCR. A presença do gene *mec*A e determinação do *SCCmec* foram realizadas pela PCR. A avaliação da similaridade genética dos isolados da mesma espécie foi realizada por PFGE. Dos 429 neonatos admitidos na UTI, 392 tiveram swabs coletados na admissão e alta. A prevalência de SCoN na hospitalização foi de 67,1% (95% IC 62,5-71,6). A incidência de SCoN na coorte dos neonatos durante o período de hospitalização foi de 56,1% (95% IC 51,1-61,1). As espécies isoladas com maior frequência foram *S. haemolyticus* (37,6%) e *S. epidermidis* (34,6%). A frequência de isolados resistentes aos antibióticos β-lactâmicos foi significativamente maior na alta do que na admissão, com 91,8% e 58,0%, respectivamente, sendo que na alta observou-se um número elevado de cepas multiresistentes (42,0%). O gene *mec*A também foi mais prevalente nas cepas isoladas na alta em relação à admissão, com 82,9% e 60,0% respectivamente. O SCC*mec* tipo I foi o mais identificado (34,3%). Houve grande diversidade genética entre os isolados da mesma espécie identificados tanto na admissão e quanto na alta. A UTI neonatal representa um ambiente rico para aquisição de cepas de SCoN colonizadoras multiresistentes, o que pode aumentar o risco de infecções invasivas por SCoN multiresistentes. Esses neonatos após a alta hospitalar, podem atuar como reservatórios de cepas SCoN multiresistentes e consequentemente apresentarem grande potencial de disseminação dessas cepas na comunidade.

Palavras-chave: *mec*A, *Staphylococcus* coagulase negativa, SCCmec, UTI neonatal.

Abstract

Nasal colonization with coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) has been described as a risk factor for subsequent systemic infection. We assessed the CoNS colonization at the admittance and discharge, among newborns hospitalized at the biggest intensive care unit (ICU) neonatal in Goiania, Brazil. All newborns admitted at the ICU between July/2007 and May/2008 was eligible. Nasal swabs were collected at admission and discharge. Isolates were screened in manitol agar, TSA, and TSB with 5µg/mL of oxacillin and NaCl (5%). CoNS isolates were tested for susceptibility to antimicrobials by disc diffusion method according to CLSI 2005. Species identification was performed by ITS-PCR methodology. The presence of the *mec*A gene and SCCmec type were analyzed by PCR. Among 429 neonates admitted to the ICU, 392 had nasal swabs collected at both, admission and discharge. The prevalence of CoNS during hospitalization was 67.1% (95% CI 62.5-71.6), The incidence of CoNS during the hospitalization period in the neonatal cohort was 56.1 (95% CI 51.1-61.1). The most frequently isolated species were *S. haemolyticus* (37.6%) and *S. epidermidis* (34.6%). The percentage of β-lactam resistant isolates at discharge (91.8%) was significantly higher than at admittance (58%). The frequency of multiresistant CoNS isolated during discharge (42.0%) was also significantly elevated. The *mecA* gene was also more prevalent among strains isolated at discharge (82.9%) than admittance (60.0%), being type I SCC*mec* the most frequent. There was a great genetic diversity among isolates of the same species recovered at admittance and discharge. The ICU neo represents a risk environment for the colonization of multiresistant CoNS strains, and consequently a risk for invasive infections with multiresistant CoNS. Hospitalized neonates, can become a reservoir of multiresistant SCoN strains and after discharge presents with a dissemination potential of those strains into the community.

Keywords: *mec*A, *Staphylococcus* coagulase negative, SCC*mec*, ICU.

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação dos tipos de SCC*mec* identificados entre os *Staphylococcus* sp 11

Figura 2 – Procedimento Operacional Padrão (POP) do processamento e análise das amostras coletadas com *swabs* para isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp 22

Figura 3 – Fluxograma das amostras coletadas e dos SCoN isolados de neonatos admitidos na UTI neonatal em um hospital no município de Goiânia durante jul/2007 a mai/2008.. 28

Figura 4 – Frequência de resistência aos antimicrobianos testados dos isolados de SCoN entre os neonatos colonizados atendidos na UTI neonatal de um Hospital em Goiânia 29

Figura 5 – Antibiograma representativo de uma cepa de SCoN resistente a vários antimicrobianos 30

Figura 6 – Eletroforese em agarose do produto de amplificação da ITS – PCR.... 31

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do gene *mec*A dos isolados de SCoN, pela técnica de PCR 32

Figura 8 – Dendrograma dos isolados na admissão e alta de *S. epidermidis*. 34

Figura 9 – Dendrograma dos isolados na admissão e alta de *S. haemolyticus*. 35

Lista de Tabelas

Tabela I – Relação de microrganismos/sepse associados à maturidade 14

Tabela II – Sequência de *primers* utilizados para o SCC*mec* PCR Multiplex 26

Tabela III – Espécies identificadas entre os neonatos colonizados por SCoN um uma UTI neonatal no município de Goiânia. 31

Tabela IV – Tipos de *SCCmec* identificados entre os isolados de SCoN na UTI neonatal, durante o período de julho/2007 a maio/2008 33

Tabela V – Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de SCoN isoladas durante o período de internação de neonatos em uma UTI neonatal durante o período de julho/2007 a maio/2008 na cidade de Goiânia..... 34

Tabela VI – Características epidemiológicas dos pacientes hospitalizados durante o período de julho/2007 a maio/2008 em uma UTI neonatal em Goiânia... 35

Lista de Abreviaturas

AN – Ágar Nutriente

CCIH – Comissão de Controle e Infecção Hospitalar

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CPAP – *Continuous positive airway pressure*

CVC – Cateter Venoso Central

CA-SCoN – *Staphylococcus* coagulase negativa adquirido na Comunidade

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CONEP – Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa

HA-SCoN – *Staphylococcus* coagulase negativa adquirido no Hospital (nosocomial)

ITS – *Internal Transcribed Spacer*

CIM – Concentração inibitória mínima

MLSB – Fenótipo de resistência a Macrolídeos, Lincosamina e Estreptograminas do grupo B

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MRSE – *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina

MR – ScoN – *Staphylococcus* coagulase negativa resistente à meticilina

SCoN – *Staphylococcus* coagulase negativa

PBPs – *Penicillin Binding Protein*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE – Eletroforese em campo pulsante

PMN – Polimorfonuclear

PIA – Adesina Intracelular Polissacarídica

POP – Procedimento Operacional Padrão

TSA – *Tripticase Soy Agar*

TSB – *Tripticase Soy Broth*

RN – Recém nascido

SCC*mec* – Cassete cromossomal estafilocócico *mec*

SIRA – Síndrome da Angústia Respiratória do recém nascido

UTI neonatal – Unidade de Tratamento Intensivo neonatal

VRE – Enterococos resistente à vancomicina

1. Introdução

1.1 Apresentação

A Unidade de Tratamento Intensivo neonatal (UTI neonatal) recebe crianças de 0 a 28 dias (período neonatal), principalmente nas primeiras horas de vida do neonato, pois é o momento em que as complicações pós-parto são mais frequentes. Na UTI, é esperada uma relação de profissionais de enfermagem de acordo com a quantidade (número) de leitos na unidade. Desta forma, é preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um técnico de enfermagem para até dois recém nascidos (RN) (proporção esperada de 0,4) e um enfermeiro para cada cinco RN. Esses profissionais estarão lidando diretamente com o RN, por isso devem evitar ao máximo a exposição da criança a microrganismos ou a situações que possam contribuir para o desenvolvimento de infecções. Medidas simples de controle como lavar as mãos com sabonete antiséptico (2% de clorexidina) antes e após o cuidado e manipulação de cada neonato já são conhecidamente eficientes para minimizar possíveis situações de risco, principalmente controle de surtos (ANVISA, 2008).

Segundo critérios clínicos, as principais causas de internação na UTI neonatal são de origem respiratória, como Síndrome da Angústia Respiratória do RN (SIRA) e Síndrome da Aspiração de Mecônio, além de sepse neonatal. A definição de sepse ocorre de forma muito subjetiva pela equipe médica, pois normalmente apresenta sintomas inespecíficos como apnéia e febre, e também a correlação com a resposta orgânica pelo paciente (Levy et al., 2003). Neste sentido, a Proteína C Reativa, uma prova de resposta inflamatória, possui um papel importante no diagnóstico do neonato, além de ser utilizada também no controle de cura do paciente. Os neonatos podem adquirir microrganismos pelo canal do parto (transmissão vertical), nas unidades neonatais (infecção nosocomial), e em seu domicílio (infecções comunitárias), sendo que a etiologia, medidas de prevenção e prognóstico podem ser diferentes (Lopez Sastre and Perez Solis, 2006). Como essas doenças podem estar relacionadas, e também pelo fato de se tratar de uma população com alto risco em desenvolver infecção, o uso da antibioticoterapia é muito comum no meio clínico. Assim, a terapia empírica nesses ambientes pode promover uma drástica seleção de cepas multiresistentes, que podem

colonizar os profissionais que ali trabalham e também os pacientes hospitalizados (Jarvis, 1996).

A colonização dessas crianças é o primeiro passo para o desenvolvimento de infecções. De acordo com D'Angio et al (1989), neonatos colonizados por *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) possuem um risco maior de adquirir infecções por esses microrganismos. Muitas das infecções nosocomiais podem ser resultado de colonização prévia, visto que pacientes hospitalizados são colonizados rapidamente pela microbiota desse ambiente, e qualquer desequilíbrio orgânico ou procedimento terapêutico (como uso de antimicrobianos) pode promover uma situação para o surgimento de infecções oportunistas (Jarvis, 1996). Crianças admitidas na UTI neo são, na sua maioria, imunocomprometidas, debilitadas, que podem ser submetidas a procedimentos invasivos, sendo a colonização nasal ou da pele, por SCoN, um fator de risco considerável para adquirir infecções (Costa et al., 2004). E o tempo de internação é essencial para determinação da colonização. Campeotto et al (2004) verificaram que o tempo médio de colonização por SCoN em neonatos varia de 15 a 22 dias, sendo que o uso de terapia antimicrobiana empírica teve papel fundamental na seleção de cepas multiresistentes colonizadoras.

A colonização ocorre muitas vezes por mais de um microrganismo. Pode ser por patógenos da mesma espécie ou de espécies diferentes, fato esse denominado pelos pesquisadores como co-colonização ou múltipla colonização. Essa condição predispõe os microrganismos a sofrerem transferência horizontal de genes de resistência e virulência, como *mec*A (resistência aos β-lactâmicos e genes que codificam proteínas de adesão) facilitando a sua permanência no local (Brugger et al., 2009).

O estado imunológico do neonato é um fator importante para o surgimento de infecções, e pode favorecer a colonização por microrganismos maternos ou presentes no ambiente. Barreiras naturais como acidez estomacal, ou produção de pepsina, ainda não estão bem desenvolvidas até a 3ª ou 4ª semana após o nascimento, tornando mais suscetível o seu trato gastrointestinal. Na resposta celular, os leucócitos são menos bactericidas e fagocitários. Para a resposta humoral, as imunoglobulinas são praticamente inexistentes, sendo que a IgG do neonato é de origem materna. Deve ser levado em consideração que a transferência vertical de anticorpos ocorre a partir da 29ª semana de gestação; dessa forma, crianças com 25-28 semanas nascem sem anticorpos

maternos, tornando-se assim ainda mais suscetíveis a infecções (Srivastava and Shetty, 2007).

1.2. Agente etiológico

Os estafilococos são cocos Gram positivos, dispostos isoladamente, aos pares e agrupados em forma de cachos, sendo que a maioria possui diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm. São microrganismos imóveis, anaeróbios facultativos e possuem a capacidade de se desenvolver em meios com alta concentração de NaCl. Apresentam teste positivo para catalase, pois catabolizam o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Esse teste é utilizado para diferenciá-los dos *Streptococcus* sp. Pode ser também realizado o teste da coagulase, que auxilia na determinação de patogenicidade que agrupa os estafilococos em coagulase positiva (*S. aureus*) e coagulase negativa (SCoN). Os *S. aureus* são importantes microrganismos com alto grau de virulência, entretanto muitos SCoN são sabidamente patogênicos em diversos processos infecciosos. Os SCoN não produzem a coagulase, uma enzima que se liga a um fator do soro, fazendo assim a conversão do fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo. Suas colônias em agar sangue são esbranquiçadas, bem delimitadas, podendo ou não ser brilhantes (Murray et al., 2005).

Os *Staphylococcus* sp. correspondem a um grupo de bactérias que estão presentes tanto em animais quanto em humanos. A primeira descrição foi feita em 1884 por Rodenbach sobre *Staphylococcus albus*, uma espécie não patogênica (Piette and Verschraegen, 2009). O gênero *Staphylococcus* mais de 40 espécies descritas (Rogers et al., 2009), sendo quase a metade presente nos seres humanos, porém os mais prevalentes são *S. aureus* (coagulase positiva) e, dentre os SCoN mais relevantes na espécie humana, destacam-se *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. sacharolyticus*, *S. caprae*, *S. pasteuri*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* (Kloos and Bannerman, 1994; Murray et al., 2005).

Muitos possuem locais específicos de colonização, como por exemplo, *S. aureus* nas fossas nasais e *S. capitis* nas glândulas sebáceas. *S. haemolyticus* e *S. hominis* são encontrados próximos a glândulas apócrinas, como axilas, enquanto *S. epidermidis* encontram-se amplamente distribuídos pelo corpo (Murray et al., 2005).

1.2.1 Identificação

Dentre os métodos de identificação de espécies de SCoN, os métodos fenotípicos ainda são utilizados pelos laboratórios clínicos como uma das principais ferramentas diagnósticas, principalmente por semi-automação, que pode gerar um aumento de custos. A grande maioria dos ensaios comerciais é baseada em técnicas colorimétricas, o que pode produzir, algumas vezes, resultados ambíguos e subjetivos (Couto et al., 2001).

A técnica de *Internal Transcribed Spacer* (ITS-PCR) é baseada na caracterização de regiões entre os genes que codificam para os RNA ribossomais 16S, 23S e 5S. Esses genes são separados por regiões que apresentam alto grau de variabilidade na sequência e tamanho dos genes, e também entre as espécies (Gurtler and Stanisich, 1996). Em estafilococos, essas regiões estão presentes no operon *rrn*, e devido a esse polimorfismo a técnica de PCR é aplicada usando oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem sequências conservadas de regiões próximas aos genes 16S e 23S (Couto et al., 2001). Jensen et al (1993) foram os primeiros a utilizar a técnica de ITS-PCR na diferenciação estafilocócica, identificando com êxito espécies de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. warneri*. Existem outras regiões conservadas que pode auxiliar na identificação de espécies estafilocócicas, como o gene da termonuclease (*nuc*), onde Sasaki et al (2010) desenvolveram um Multiplex-PCR para sua identificação.

A importância em identificar a espécie de SCoN colonizadora ou responsável por uma infecção está no fato de algumas espécies possuírem certa afinidade para determinados sítios anatômicos e/ou procedimentos, como por exemplo *S. epidermidis* presentes em cateter venoso central (CVC), além de algumas espécies apresentarem perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos bem diferente e um menor poder de virulência, em comparação a *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* que são microrganismos oportunistas mais agressivos (Venkatesh et al., 2006). Sendo assim, acreditamos que a realização de um diagnóstico precoce e correto pode auxiliar na identificação de uma possível fonte de infecção, promovendo assim um tratamento mais eficaz e menos oneroso. Com isso, concluímos que métodos moleculares são atualmente técnicas rápidas, eficientes, que surgem como alternativa para certos diagnósticos fenotípicos, muitas vezes subjetivos e imprecisos.

1.3. Resistência aos antimicrobianos

1.3.1. Introdução de agentes antibacterianos

No momento em que a penicilina foi introduzida na clínica em 1944, a eficiência no tratamento de infecções bacterianas era indiscutível. Entretanto, em 1950 foram identificadas cepas resistentes (Livermore, 2000a) que produziam a enzima β-lactamase plasmidial, responsável pela degradação do antibiótico no meio extracelular, o que comprova a capacidade deste gênero em adquirir facilmente genes de resistência antimicrobiana. Atualmente 90% de *S. aureus* isolados nos Estados Unidos são resistentes à penicilina, de acordo com *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC (2005), e cepas de SCoN apresentam perfil semelhante de resistência (Becker et al., 2006).

A introdução da oxacilina e outras penicilinas semi-sintéticas, em 1959, foi um avanço na terapêutica antimicrobiana contra os estafilococos (Martins 2007), pois são drogas resistentes às β-lactamases possuindo assim um maior poder de ação frente a estes microrganismos. A partir de 1961, foi possível identificar cepas de *Staphylococcus* sp resistentes à meticilina (Hiramatsu et al., 2001).

Em um grande estudo realizado na Espanha em 2004 foi avaliado a evolução do perfil de resistência entre os *S. aureus* / SCoN identificados em infecções (feridas, hemoculturas) entre os anos de 1986 a 2002, e observou-se resistência à oxacilina (1,5% / 32,5% em 1986 para 31,2% / 61,3% em 2002), eritromicina (7% / 41,1% em 1986 para 31,7% / 63% em 2002), gentamicina (5,2% / 25,4% em 1986 para 16,9% / 27,8% em 2002) e ciprofloxacina (0,6% / 1,1% em 1986 para 33,9% / 44,9% em 2002). Dentre as espécies mais isoladas em 2002, *S.aureus* foi identificado em 54,3% dos quadros infecciosos e os SCoN em 45,7% (Cuevas et al., 2004). Esses dados demonstram uma grande evolução no perfil de resistência entre os estafilococos, no qual podemos sugerir que a pressão seletiva que ocorre no ambiente nosocomial interfere drasticamente na evolução do microrganismo, dificultando cada vez mais o tratamento dessas doenças infecciosas (sepse, infecções de sítio cirúrgico).

Desta forma, os processos biológicos que estão mais associados ao acúmulo de resistência aos antimicrobianos pelas bactérias são: nova seleção (uso indiscriminado de

antimicrobianos), genes epidêmicos (transmissão horizontal e vertical de genes de resistência como *mec*A) e cepas epidêmicas (no ambiente hospitalar, microrganismos multiresistentes como bacilos portadores de betalactamase com espectro ampliado – ESBL) (Livermore, 2000b). Os elementos genéticos possuem importante papel nesta disseminação de resistência, além também no transporte de fatores de virulência em estafilococos. A ação de bacteriófagos, ilhas de patogenicidade, cassetes cromossomais, plasmídeos, ilhas genômicas, sequências de inserção e transposons são exemplos de como pode ser esta transferência (Ito et al., 2003; Lindsay and Holden, 2004; Gill et al., 2005).

Os estafilococos, como nas demais bactérias com parede celular, possuem proteínas de ligação à penicilina (*Penicilin-Binding-Proteins* PBP), que também estão envolvidas no metabolismo de síntese da parede celular. Pode ocorrer a produção de uma proteína modificada como, por exemplo, a PBP2a ou PBP', que possui uma menor afinidade aos antibióticos β-lactâmicos. A PBP2a é codificada pelo gene *mec*A, presente no cassete cromossomal estafilocócico *mec* (*staphylococcal chromossome cassete mec* – SCC*mec*). O SCC*mec* é um elemento genético móvel que permite a troca de genes de resistência entre as cepas de *Staphylococcus*, e possui uma ampla distribuição entre espécies SCoN meticilina resistente (MR-SCoN) e *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) (Katayama et al., 2001). A grande importância do fenótipo MR-SCoN é que esses microrganismos podem servir como reservatórios de genes de resistência, e por possuírem mecanismos de transferência genética, podendo promover o surgimento de novos patógenos resistentes.

1.3.2 Terapia das infecções estafilocócicas

A meticilina é utilizada como marcador fenótipo de resistência devido ao seu uso primário no tratamento de infecções estafilocócicas. Como a penicilina foi no passado muito eficiente nessa terapêutica e hoje não é mais, os β-lactâmicos semi-sintéticos (meticilina) foram inseridos com grande eficiência. Contudo, diversos estudos relatam um aumento no perfil de resistência estafilocócica a esses antimicrobianos (Cuevas et al., 2004), o que faz a necessidade no uso de novos agentes antibacterianos no tratamento dessas infecções estafilocócicas, como vancomicina e teicoplanina.

Esse aumento de cepas resistentes à meticilina no ambiente hospitalar produz ações terapêuticas mais agressivas para tratamento, favorecendo a prática da terapia empírica ao uso dos glicopeptídeos (vancomicina) uma rotina cada vez mais comum nos hospitais, e devido a esse uso inadequado, cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina estão se tornando cada vez mais comuns no ambiente hospitalar (Natoli et al., 2009). E esse perfil de resistência aos antimicrobianos é mais evidente em isolados SCoN em comparação aos *S. aureus*, principalmente para teicoplanina (Livermore, 2000a).

Outro grupo de antimicrobianos muito utilizados no tratamento de infecções por Gram positivos são os macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas. Durante muitos anos esses agentes foram eficientes no tratamento de doenças infecciosas, mas com a evolução microbiana, diversos mecanismos de resistência antimicrobiana foram desenvolvidos como forma de adaptação ao ambiente, uma seleção natural. A resistência a macrolídeos, lincosamina e estreptograminas do grupo B (MLSB) pode ser identificada nas espécies de estafilococos devido a várias alterações genéticas microbianas. As mais importantes são mecanismos ativos de efluxo (fenótipo MSB) e por modificação do alvo ribossomal, sendo que esse último confere resistência para todos os três antimicrobianos, ou seja, resistência MLSB (Merino-Diaz et al., 2007). Drogas como quinupristina-dalfopristina inibem o crescimento de grande parte das cepas estafilocócicas, embora possa haver o perfil MLSB que pode prejudicar a terapêutica (Livermore, 2000b).

O uso irracional de antimicrobianos promoveu a seleção de cepas resistentes no decorrer dos anos, tanto no ambiente hospitalar, quanto comunitário. Consequentemente, podemos concluir que o ambiente hospitalar age como reservatório de resistência, sendo possível identificar um número ainda maior de cepas multiresistentes devido à pressão seletiva que ocorre no meio e a facilidade de veiculação de microrganismos de diversos centros de saúde pelos profissionais que ali trabalham. Porém, essa veiculação para a comunidade está se tornando comum, devido principalmente à falta de medidas preventivas nos centros de saúde (Cuevas et al., 2004). Com essa disseminação pela comunidade, cepas multiresistentes podem colonizar qualquer pessoa suscetível.

Assim sendo, essa condição de multiresistência pode-se de fato ser verificado em diversos hospitais, não somente brasileiros. Essa situação é bastante evidente para os estafilococos, que se adaptam rapidamente ao ambiente e possuem grande facilidade de recombinação genética, com disseminação de resistência antimicrobiana (Yoshida et al., 2009).

Um grande estudo feito por Cars et al (2001), avaliaram o uso de antimicrobianos em diversos países da Europa. Os autores identificaram uma grande variação de antibióticos no ambiente hospitalar, no qual diversos fatores podem estar relacionados como contextos históricos, sociais e culturais, além de variações existentes no cuidado com a saúde dos pacientes. Com o baixo consumo desses antimicrobianos associado a boas práticas de controle de infecções hospitalares (ex.: uso de mupirocina), os índices de infecções nosocomiais poderão diminuir drasticamente, o que demonstra a necessidade de restrição e adequação no uso de drogas para o tratamento de doenças bacterianas (Cars et al., 2001).

Poucos agentes quimioterápicos novos para o combate de infecções estafilocócicas foram produzidos nas últimas três décadas, mas a situação atual está melhorando. Na última década, a introdução de novos agentes como linezolida, daptomicina e tigeciclina, melhorou de forma expressiva a terapêutica de pacientes infectados por microrganismos multiresistentes, como enterococos resistentes à vancomicina (VRE), MRSA e MR-SCoN, sendo estes antimicrobianos considerados de eficácias semelhantes (Dotis et al., 2010; Gardiner et al., 2010). Porém, até mesmo esses novos quimioterápicos, após um longo período de uso podem promover o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, o que nos faz enfatizar cada vez mais sobre práticas para uso racional de antimicrobianos (Yoshida et al., 2009).

1.4. Técnicas moleculares aplicadas no estudo da epidemiologia molecular de *Staphylococcus* sp

Técnicas laboratoriais de epidemiologia molecular auxiliam os profissionais da saúde a compreender melhor o curso de um surto infeccioso, ou uma possível origem de infecções contínuas em uma comunidade ou uma unidade de saúde. A técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) é considerada por muitos autores como sendo

padrão-ouro na tipagem molecular de cepas de estafilococos, tendo inclusive reconhecimento pelo CDC (Bannerman et al., 1995; Tenover et al., 2009). Na atualidade, é um método de escolha para muitos pesquisadores, pois fornece uma boa reprodutibilidade, grande poder discriminatório e um perfil de DNA cromossômico característico (Pfaller et al., 2001).

A técnica de PFGE é baseada na eletroforese em campo pulsado, que permite a migração de moléculas de DNA com alto peso molecular, a qual foi relatada pela primeira vez em 1983 (Herschleb et al., 2007). Para que o material seja analisado é necessário utilizar enzimas que promovam macrorestrições em regiões do DNA, reconhecendo 6 a 8 bases (pouco frequentes), originando um produto com vários fragmentos (até 20), variando de 10 a 800kp, que posteriormente são aplicados em gel de agarose. A análise das amostras é feita por comparação dos fragmentos, sendo utilizados também marcadores de tamanho conhecido. Esses perfis estabelecidos poderão ser relacionados ou não com isolados de diferentes fontes e também poderão estabelecer correlações com origens de disseminação local ou mundial desses microrganismos (Tenover et al., 1997), além de auxiliar no controle da disseminação desses clones no ambiente nosocomial principalmente (Mulvey et al., 2001).

A determinação da origem bacteriana no cenário epidemiológico possui grande relevância quando se deseja obter dados que sejam importantes para a caracterização de um surto, no acompanhamento de pacientes hospitalizados. Nesse sentido, os estafilococos que possuem o gene *mec*A, apresentam também em seu material genético um cassete cromossomal que carreia este gene, sendo denominado SCC*mec*. Esse cassete alberga genes de virulência que podem caracterizar epidemiologicamente as cepas que o possuem, determinando sua origem. Assim, o SCC*mec* é o elemento genético móvel responsável por carrear genes de resistência entre as espécies estafilocócicas.

O SCC*mec*, representado na Figura 1, se apresenta em diferentes combinações do complexo *mec*, composto por IS431, *mec*A e dos genes regulatórios *mec*I e *mec*RI; além do complexo *ccr*, que codifica o grupo de enzimas recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*, composto pelos genes *ccr*A e *ccr*B ou *ccr*C (Kondo et al., 2007). Os componentes restantes do SCC*mec* são denominadas regiões J (regiões J1, J2 e J3) cujas funções ainda não foram esclarecidas. Porém em alguns casos, esses

componentes podem albergar genes de resistência antimicrobiana. O seu local de inserção no cassete pode então ser resumido como J1-*ccr*-J2-*mec*-J3 (Milheiriço et al., 2007).

Devido a essa grande diversidade, Mombach et al (2007) demonstraram em seu estudo que seis tipos de SCC*mec* já foram descritos para o *S. aureus* e cinco tipos (I-V) para SCoN, representados na Figura 1. Os tipos I, II e III são relacionados a cepas hospitalares (HA-SCoN), enquanto que os tipos IV e V estão relacionados às cepas de origem comunitária (CA-SCoN). Acredita-se que cepas hospitalares possuam características mais virulentas que cepas comunitárias, entretanto os resultados ainda são inconclusivos (Ganga et al., 2009). Na literatura, ainda não foi descrito o tipo VI em SCoN e pouco se sabe a respeito desse cassete cromossomal nessas espécies, mas acredita-se que possuem estruturas mais variadas ainda não descritas para *S. aureus* (Ruppe et al., 2009). Entretanto, recentemente foi caracterizado um novo tipo, o SCC*mec* VII, uma cepa de MRSA comunitário identificado em Taiwan (Higuchi et al., 2008), e o tipo VIII (Chen et al., 2009). Isso demonstra a constante evolução do cassete cromossomal, na recombinação e inserção de elementos genéticos.

O *S. epidermidis* foi descrito como um dos primeiros isolados de SCoN a ser portador do SCC*mec*, porém a origem do cassete cromossomal é desconhecida (Hanssen and Ericson Sollid, 2006). Com isso, cepas de SCoN podem servir de reservatório para genes de resistência que podem ser transferidos para outros microrganismos Gram positivos, como *S. aureus* (Mongkolrattanothai et al., 2003). Fato esse importante, pois a disseminação de SCoN no ambiente nosocomial é muito grande.

Foi identificada a existência de uma variante genética única do gene *ccr*AB em cepas de MRSA, que também foi encontrada em isolados de MR-SCoN (Hanssen et al., 2004). Acredita-se que ambos contêm o mesmo *pool* de genes, entre os de recombinase e resistência. Contudo, é necessário ainda definir claramente os mecanismos de transferência de resistência entre as espécies de estafilococos (Mombach Pinheiro Machado et al., 2007).

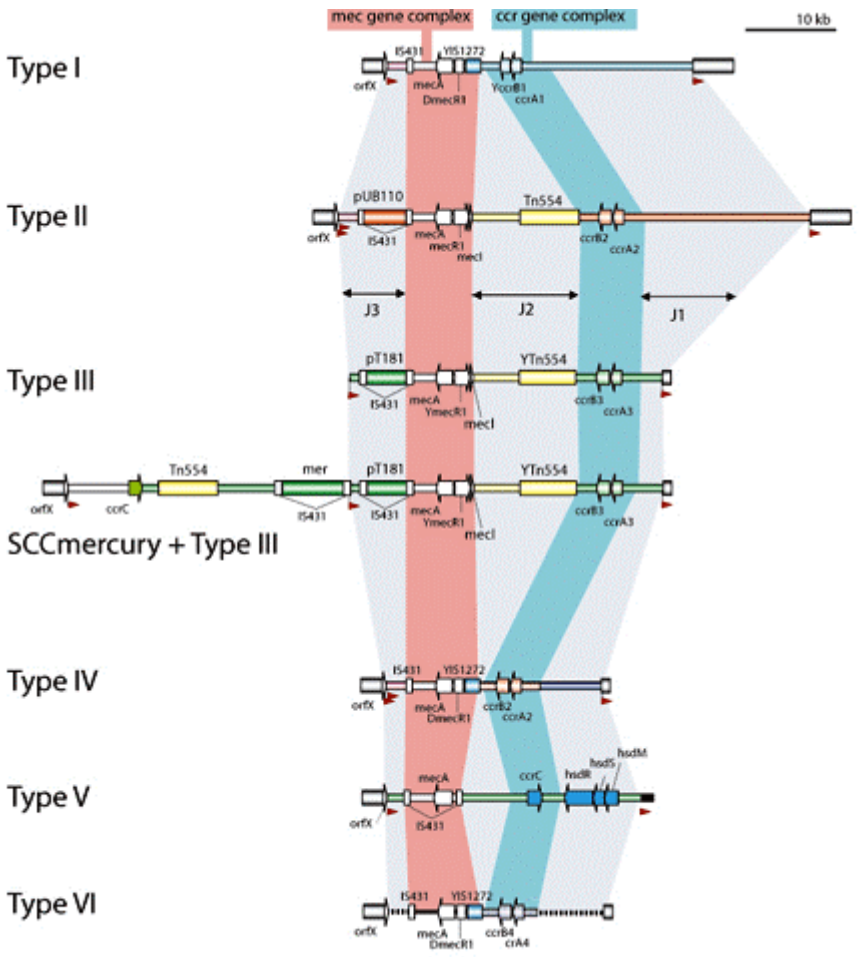

Figura 1 – Representação dos tipos de SCC*mec* identificados entre os *Staphylococcus* sp (Research-Japan).

Os SCoN possuem uma grande diversidade de elementos genéticos. Zhang et al (2009) fizeram um estudo para avaliar o perfil de SCC*mec* de SCoN isolados em animais. Os tipos I, III, IV e V foram identificados, o que demonstra uma grande diversidade desses elementos genéticos no ambiente. Outro estudo analisou esta mesma diversidade genética, porém em SCoN isolados de humanos de diferentes regiões africanas. O *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* foram diretamente relacionados com os tipos IV e V, respectivamente. Esses autores demonstraram também que as cepas de SCoN resistentes à meticilina possuem um amplo e diversificado reservatório de resistência na comunidade (Ruppe et al., 2009).

A importância de determinar o tipo SCC*mec* em SCoN é devido a necessidade em caracterizar geneticamente esses microrganismos circulantes, avaliando possíveis origens (comunitária ou hospitalar), além destes cassetes serem responsáveis por carrear genes de resistência e transferi-los (transferência horizontal) para *S. aureus* sensíveis à

meticilina (MSSA), criando assim um novo clone (MRSA), podendo originar um possível surto infeccioso (Berglund and Soderquist, 2008; Ibrahem et al., 2009).

1.5. Infecções nosocomiais por SCoN

Durante muitos anos, os SCoN foram considerados por clínicos e microbiologistas como sendo contaminantes em hemoculturas no diagnóstico de sepse e outras infecções não sendo considerados patogênicos (Kloos and Schleifer, 1975). Desta forma, entre os estafilococos somente os *S. aureus* era considerada a espécie frequentemente identificada em infecções e intoxicações em humanos e animais (Kloos and Schleifer, 1975). Porém, nas últimas décadas (anos 80 e 90), esses microrganismos foram relacionados a vários quadros clínicos importantes (Longauerova, 2006), sendo o principal agente etiológico em muitos casos de infecções, principalmente de pessoas imunocomprometidas, que são normalmente isoladas em hemoculturas (Huebner and Goldmann, 1999). Entretanto, a identificação de SCoN em hemocultura deve ser analisada com cautela pelos profissionais de saúde, pois a sua presença em vários sítios, especialmente a pele, pode facilmente contaminar uma amostra clínica.

O fato de SCoN terem emergido nos últimos anos como potenciais agentes etiológicos infecciosos, remete-se principalmente ao avanço da medicina (diagnósticos mais precisos e estudos epidemiológicos eficientes). Podemos concluir então que o uso de novas práticas no tratamento clínico pode permitir uma sobrevida maior dos pacientes, aumentando o seu tempo de internação, o que irá modificar o perfil desta população, pois são continuamente alvos de procedimentos invasivos (UTI), uso de diversas drogas, tornando-se mais suscetíveis a infecções (oportunistas).

Os SCoN fazem parte da microbiota do hospedeiro, principalmente da pele e mucosas. Entretanto, a pele pode sofrer algum trauma por meio de agulhas ou outros procedimentos invasivos resultando no aparecimento de uma continuidade entre a superfície e o interior do corpo. Desta forma, são apresentadas condições favoráveis que permitem para os mesmos invadirem o organismo suscetível, causando doença (Hudome and Fisher, 2001; Pessoa-Silva et al., 2004). E este quadro é muito observado no ambiente hospitalar, o que nos faz enfatizar cada vez mais sobre medidas preventivas para controle de infecções.

Muitas das infecções sanguíneas nosocomiais são originadas em pacientes que fazem o uso de cateter venoso central (CVC) (Walz et al., 2010). Os SCoN estão entre os microrganismos mais identificados em infecções associadas ao uso de CVC. Normalmente, o curso da infecção decorre da migração de microrganismos presentes na pele para o local da inserção do cateter, o que irá promover uma colonização do tipo cateter e favorecer a formação de biofilme (Walz et al., 2010).

Esta capacidade de formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência dos estafilococos. Biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana, que vive em harmonia para se adaptar, sobreviver e se disseminar em um determinado local (organismo), frente às circunstâncias expostas. É importante mencionar que esta condição ocorre principalmente em superfícies sólidas, como cateteres, mas pode ocorrer também em tecidos moles suscetíveis, como válvulas cardíacas naturais, sendo que espécies de *Pseudomonas* e enterococos possuem maior capacidade de formação nestes locais em relação aos estafilococos (Fadeev and Nemtseva, 2009).

Quando as bactérias estão presentes no biofilme, ocorrem diversas formas de adaptação ao meio que estão inseridas. Essas populações demonstram diferenças na expressão em suas proteínas de superfícies, resistência aos antimicrobianos, na utilização dos nutrientes e fatores de virulência (Zhang and Mah, 2008; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009).

Outra característica de adaptação é a resistência frente à fagocitose pelas células leucocitárias do hospedeiro por *S. epidermidis*. A proteção contra fagocitose por polimorfonucleares (PMN) e mecanismos de imunidade inata é mediada por adesina intracelular polissacarídica (PIA), sendo a sua regulação exercida pelo *operon ica* (Vuong et al., 2004).

O biofilme é constituído por uma cama externa polissacarídea, denominada de matriz microbiana, que possui papel fundamental na proteção do biofilme frente aos agentes externos, e mesmo que ela não iniba a penetração do antibiótico para o interior do biofilme, ela pode diminuir a penetração do fármaco através da expressão de genes do biofilme que são responsáveis por induzir a resistência (Jefferson et al., 2005), sendo essa resistência uma de suas principais características de adaptação. Alguns dispositivos invasivos impregnados com antimicrobianos já foram testados, porém sem muito

sucesso. O que sabemos hoje é que esse é um problema o qual está cada dia mais presente nos hospitais, principalmente em UTIs. Devido ao avanço tecnológico e novas metodologias de tratamento, o uso de dispositivos tem-se tornado frequente, fato que favorece boas condições para a adesão e multiplicação microbiana.

A formação de biofilme está presente como causa ou agravo de várias infecções crônicas, que incluem periodontites, infecções associadas a dispositivos invasivos, pneumonia, infecção crônica no trato urinário, tonsilites recorrentes, rinosinusites crônicas, otite média crônica e infecção crônica tecidual (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009).

Os SCoN são considerados como a causa mais comum de bacteremia em UTI neonatal (Kallman et al., 1997), podendo ser identificados mais de 90% dos isolados resistentes a meticilina (Yalaz et al., 2006). A tabela I mostra um estudo que verificou a relação de microrganismos/sepse em neonatos, caracterizando uma maior prevalência dos SCoN em relação aos demais patógenos. Entretanto, existe certa dificuldade para diferenciar uma sepse por SCoN de um microrganismo comensal da pele, que pode ser resultado de contaminação, ou no momento da coleta ou durante o processo de manipulação (Craft and Finer, 2001).

Tabela I – Relação de microrganismos causadores sepse associados à maturidade do RN

	Todos	Pré-termo	A termo
Nº sepse	83	72	11
Nº sepse em neonatos	75	64	11
Bactérias Gram (+)	**41 (49,4%)**	**36 (50,0%)**	**5 (45,5%)**
SCoN	26 (31,3%)	23 (32,0%)	3 (27,2%)
S. aureus	11 (13,0%)	9 (25,0%)	2 (18,2%)
Enterococcus sp	3 (3,5%)	3 (4,1%)	0
S. pyogenes	1 (1,2%)	1 (1,4%)	0
Bactérias Gram (-)	26 (31,4%)	21 (29,2%)	5 (45,5%)
Enterobacter sp	7 (8,2%)	7 (9,7)	0
Klebsiella penumoniae	9 (10,5%)	7 (9,7)	2 (18,2%)
E. coli	2 (2,3%)	1 (1,4%)	1 (9%)
Acinetobacter sp	2 (2,3%)	1 (1,4%)	1 (9%)
Aeromonas sp	1 (1,2%)	1 (1,4%)	0
P. aeruginosa	4 (4,7%)	4 (4,5%)	0
S. maltophilia	1 (1,2%)	0	1 (9%)
Infecções fúngicas	**16 (19,2%)**	**15 (20,8%)**	**1 (9%)**
Cândida albicans	15 (18,1%)	14 (19,4%)	1 (9%)
A. strictum	1 (1,2%)	1 (1,4%)	0

Fonte: Adaptado de Yalaz et al (Yalaz et al., 2006).

S. epidermidis é a espécie mais frequentemente isolada dentre os SCoN, estando associado à bacteremia com o uso de cateteres e outros procedimentos invasivos (de Mattos et al., 2003). Cerca de 70% dos isolados nosocomiais dessa espécie são meticilina resistentes (MRSE), sendo considerados reservatórios de genes de resistência, podendo transferi-los para outros estafilococos (Miragaia et al., 2002). A pele do paciente e de profissionais de saúde, equipamentos médicos, roupas dos profissionais e superfícies do ambiente hospitalar podem ser reservatórios de *S. epidermidis* multiresistentes (Aires De Sousa et al., 2000).

Por estarem presentes no ambiente e na microbiota do paciente e contaminar amostras biológicas em situações em que a antisepsia não é feita de maneira correta, a identificação de dois casos positivos ou mais pode não ser indicativo de bacteremia e/ou sepse por esse microrganismo, critério utilizado em alguns centros clínicos (Seybold et al., 2009). Faz-se necessário determinar a semelhança genética desses isolados (situação praticamente impossível nos laboratórios clínicos de hoje), pois havendo diferença, possivelmente será contaminação. Nesse sentido, foi realizado um estudo que avaliou a semelhança genética entre os isolados de SCoN em episódios de duas ou mais hemoculturas positivas. O grande número de *clusters* encontrados sugeriu que a maioria dos isolados eram contaminantes (Seybold et al., 2009). Assim, a determinação das espécies auxiliaria nesse quadro, podendo contribuir para a identificação ou não do causador da infecção, bem como da diminuição no uso de antibiótico de forma desnecessária, reduzindo custos e contribuindo para a evolução do paciente.

Um estudo de vigilância realizado na Espanha identificou as causas mais comuns de infecções nosocomiais em pacientes de UTI neonatal. Cerca de 56% das infecções eram bacterianas; dessas, 46% foram isolados SCoN, seguidas de 32% de Gram negativos (Molina-Cabrillana et al., 2006).

No Brasil, cerca de 60% das mortes em crianças no seu primeiro ano de vida ocorrem no período neonatal. Pessoa et al (2004) estimaram uma incidência de 29,4 infecções nosocomiais por 1000 pacientes por dia. Aproximadamente 40% de todas as mortes foram relacionadas a infecções hospitalares, sendo as infecções de corrente sanguínea (hemocultura) as mais comuns (50,5%), e a pneumonia a segunda causa mais prevalente (14,8%).

1.6 Justificativa

Os neonatos admitidos em UTIs correspondem a um grupo com elevado risco para doenças oportunistas e infecciosas. São pacientes muito suscetíveis, de extrema fragilidade física e imunitária. O acompanhamento desses pacientes na admissão e alta é muito importante no sentido de rastrear toda sua internação, e com isso analisar o seu estado de portador.

O desenvolvimento tecnológico científico juntamente com a introdução de novas metodologias terapêuticas promoveram uma melhora no tratamento para RN de risco. São considerados como fatores de riscos a baixa imunidade do RN, baixo peso ao nascer, doenças de base materna, parto prematuro, dentre outros (Healy et al., 2004).

Os SCoN estão entre os principais patógenos causadores de infecções nosocomiais, pois são facilmente veiculados dentro do ambiente hospitalar, possuindo fácil adaptação ao meio e também a capacidade de adquirir multiresistência. No Brasil, existe certa carência de publicações neste assunto (Mombach Pinheiro Machado et al., 2007).

Os SCoN fazem parte da microbiota do hospedeiro, porém em algumas situações como em procedimentos cirúrgicos invasivos, por exemplo, eles podem ser a causa de infecções. Esse papel foi reconhecido desde 1970. Os SCoN apresentam grande importância na bacteremia, endocardites, infecções de trato urinário, de sítio cirúrgico, endoftalmite, entre outras (Piette and Verschraegen, 2009). Dentre as mais de 40 espécies reconhecidas de SCoN (Rogers et al., 2009), o *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada em infecções nosocomiais, estando relacionada principalmente a procedimentos invasivos, como CVC e nutrição parenteral.

São considerados microrganismos oportunistas, pois em situações favoráveis para o seu crescimento, possuem a capacidade de colonizar e invadir o organismo, como por exemplo, em lesão cirúrgica. Assim a infecção nosocomial continua sendo o maior problema em UTI neonatal (Lankford et al., 2003).

Como os neonatos hospitalizados são submetidos a vários procedimentos, acabam se tornando pacientes muito suscetíveis, o que pode causar um aumento na morbidade, mortalidade, tempo de internação e custo (Lally et al., 2004).

Um pré-requisito para infecção é a colonização, e o RN possivelmente adquire grande parte dessa microbiota colonizante no ambiente (hospitalar), incluindo profissionais de saúde (Patrick et al., 1992). Medidas de controle de infecção devem ser seguidas pelos profissionais de saúde, sendo essas pré-estabelecidas pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). Estudos de vigilância devem ser realizados periodicamente pela comissão. Com isso, uma CCIH ativa e permanente possui um papel fundamental no controle e prevenção de surtos e infecções nosocomiais. Ações simples como lavar as mãos apresenta excelentes resultados na prática de controle de infecções (Lankford et al., 2003).

Devido à carência de trabalhos que demonstrem o perfil de colonização por SCoN dos neonatos hospitalizados em UTI, e da dificuldade dos profissionais de saúde em conhecer os microrganismos circulantes na unidade, verifica-se a importância deste estudo no atual cenário epidemiológico. A diminuição de infecções nosocomiais, do uso de antibióticos e consequentemente dos custos de um longo período de internação, são condições futuras que podem ser obtidas.

2. Objetivos

Geral

- Avaliar o perfil (fenótipo e genótipo) dos SCoN que colonizam os neonatos no momento da admissão e alta em uma UTI neonatal.

Específicos

- Identificar as espécies mais prevalentes de SCoN.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos destes microrganismos.
- Verificar a presença do gene *mec*A entre os isolados.
- Identificar os tipos de SCC*mec* entre os isolados.
- Avaliar a similaridade genética entre as cepas.
- Determinar a prevalência e incidência de colonização por SCoN dos neonatos.
- Identificar as características clínicas e epidemiológicas associadas à colonização por SCoN.

3. Material e Métodos

Este trabalho integra a REDE VIGIA-CRIANÇA de Goiânia, que é uma rede de vigilância para detecção de infecções bacterianas resistentes, em parceria com a UFG e Secretaria da Saúde do Estado de Goiás. Este estudo integra o componente de portador nasal e de infecções invasivas na coorte de crianças admitidas nas unidades de terapia intensiva neonatal de Goiânia por *Staphylococcus* sp.

3.1. População de estudo e coleta

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil nasceram cerca de 2.944.000 crianças no ano de 2006, sendo 87.483 em Goiás (DATASUS 2006). Em Goiânia, a Unidade de Tratamento Intensivo neonatal (UTI neonatal) do Hospital da Criança atendeu cerca de 1070 crianças durante os anos de 2007 e 2008. A capacidade desta UTI neonatal é de 26 leitos, e o corpo de profissionais no atendimento é de cinco técnicos de enfermagem, um enfermeiro e um médico plantonista, por turno.

Todos os neonatos admitidos na UTI neonatal do Hospital da Criança, no período entre julho/2007 a maio/2008, foram considerados elegíveis. Como critério de inclusão basta a criança ser internada na UTI neonatal. Os pais foram informados da pesquisa e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a participação no estudo. O protocolo de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) e pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP), atendendo à Resolução 196/96. Foi recrutado um total de 429 neonatos, sendo que amostras foram coletadas de 392 (91,4%), tanto no momento da admissão quanto da alta. Diversos fatores prejudicaram na coleta de algumas amostras (8,6%), como falta de profissional auxiliar do projeto no momento da alta e/ou admissão, alguns óbitos que não puderam ser coletados, entre outros.

Swabs nasais (Copan®) foram coletados dos neonatos no momento da admissão e da alta hospitalar pelos profissionais da UTI neonatal, e encaminhados em até 24 h em meio Stuart para o Laboratório de Microbiologia do IPTSP/UFG por uma empresa de transporte terceirizada, devidamente credenciada para transporte intra-urbano de material microbiológico.

3.2 Isolamento

O isolamento de *Staphylococcus* sp foi realizado pela semeadura das amostras em agar manitol salgado, agar *screening* TSA (*Tripticase Soy Agar*) acrescido de 5 μg/mL de oxacilina e NaCl (5%) e em agar caldo TSB (*Tripticase Soy Broth*) acrescido de oxacilina (5 μg/mL) e NaCl (5%), com posterior incubação a 37ºC por 24 a 48 hs. Todos os swabs foram congelados em TSB com 20% de glicerol a – 80ºC.

Colônias que apresentaram crescimento com halo bem delimitado em agar manitol, com coloração branca, acinzentadas a transparentes, foram repicadas em agar nutriente (AN) e incubadas a 37ºC por 24 horas. Todos os isolados foram submetidos à coloração de Gram, sendo selecionados aqueles que apresentaram cocos Gram positivos isolados, em pares e/ou dispostos em cachos.

3.3 Provas de identificação microbiana

Para diferenciar os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* foi realizado o teste da catalase. As amostras foram repicadas em AN a 37ºC por 24 horas. Após esse período, com o auxílio de uma alça de platina, retirou-se uma colônia e esta foi transferida para uma lâmina de vidro limpa e numerada. Em seguida, uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% foi colocada sobre a colônia, e verificou-se a formação de bolhas. A prova foi considerada positiva, quando houve aparecimento rápido e produção sustentada de bolhas de gás ou efervescência.

Para caracterizar *Staphylococcus* sp, realizou-se a prova para produção de coagulase em tubo a partir de cepas repicadas em AN e incubadas por 24 horas a 37ºC. Plasma citratado de coelho foi diluído em salina esterilizada, sendo distribuído 0,3 mL em cada tubo teste. Em seguida, os isolados foram inoculados com o auxílio da alça de platina e incubados a 37ºC, com leitura realizada em 2, 4, 6 e 24 horas. A leitura foi considerada positiva para qualquer tempo analisado, independente do grau de formação de coágulo.

Um teste auxiliar também foi realizado para caracterizar o gênero estafilococos, a prova da DNAse. A presença dessa enzima em *S. aureus* promove a quebra das ligações fosfodiester na molécula de DNA da bactéria. Os isolados foram repicados em

agar DNAse a 37ºC por 24 horas. Após esse período, acrescentou-se na placa uma solução de HCl a 6N e verificou-se a formação de halo em volta das colônias. Quando não houve formação do halo, definiu-se como DNAse negativa (SCoN), e com a formação do halo, coagulase positiva (*S. aureus*). Todos os SCoN isolados foram congelados em duplicata em TSB suplementado com 20% glicerol e estocados a – 80ºC. O POP (procedimento operacional padrão) de isolamento e identificação está resumido na Figura 2.

3.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Todos os isolados de SCoN foram submetidos ao teste de disco de difusão de acordo com os critérios do CLSI (CLSI, 2005). Após crescimento das colônias em AN a 37ºC por 24 horas, um inóculo padrão de 1,5 x 10^8 ufc/mL (escala 0,5 de McFarland) foi utilizado para semeadura em placas de agar Müller-Hinton com auxílio de um swab estéril. Às placas inoculadas foram acrescentados os seguintes discos de antimicrobianos (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra): oxacilina, cefoxitina, vancomicina, teicoplanina, eritromicina, clindamicina, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, ciprofloxacina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetropim, linezolida e penicilina. A leitura dos halos de inibição foi feita de acordo com os critérios do CLSI (2005). A caracterização de resistência aos glicopeptídeos, de acordo com o CLSI, somente poderá ser realizada com a determinação da concentração inibitória mínima (MIC).

A resistência induzível *in vitro* pode ser observada em *Staphylococcus* sp que apresentam o fenótipo MLSB, referente à eritromicina, clindamicina e quinupristina-dalfopristina. Para detectar esse fenótipo, o teste de indução foi realizado conjuntamente com o método de difusão em disco, de acordo com o proposto por Fiebelkorn (2003). Após a preparação da cultura e inoculação das placas conforme descrito acima, um disco de eritromicina (15 μg) foi posicionado a 26 mm centro a centro de um disco de clindamicina (2 μg) e lateralmente a 30 mm de um disco de quinuprustina-dalfoprustina (15 μg). Após incubação a 37ºC por 24 h, a forma e o tamanho dos halos foram avaliados. Os microrganismos que não apresentaram distorção do halo foram considerados suscetíveis, e aqueles que apresentaram distorção ou achatamento do halo (forma da letra D) na região adjacente ao disco de eritromicina foram considerados resistentes (CLSI, 2005).

Determinamos como padrão de multiresistência (MDR), os isolados que apresentaram halo de resistência igual ou superior a quatro classes de antimicrobianos.

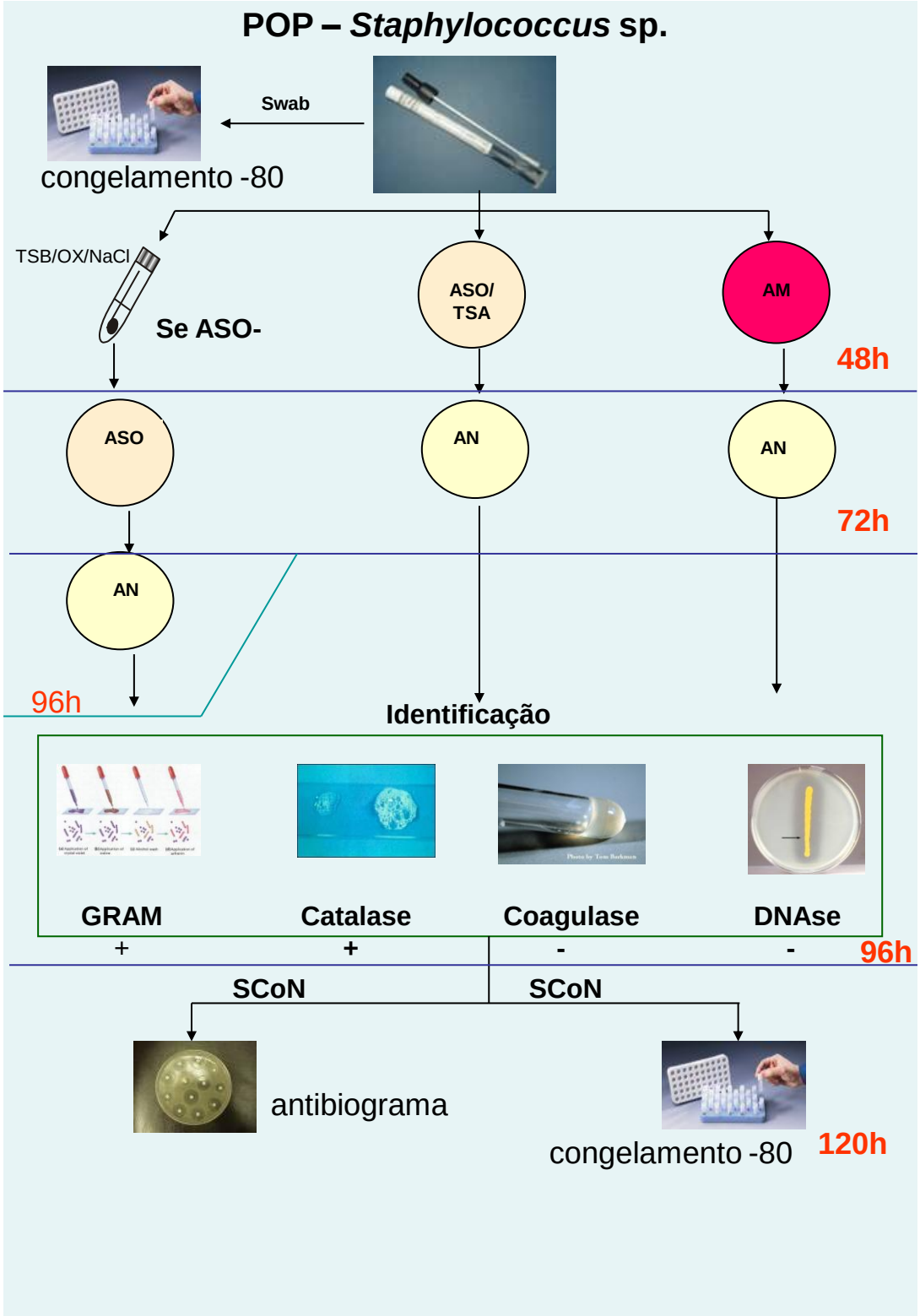

Figura 2 – Procedimento Operacional Padrão (POP) do processamento e análise das amostras de *swabs* coletados para isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp (ASO = agar *Screening* c/ oxacilina; AM = agar manitol; AN = agar nutriente; SCoN = *Staphylococcus* coagulase negativa).

3.5 Tipagem molecular

3.5.1 Extração de DNA

O DNA cromossomal foi extraído das cepas isoladas e identificadas de SCoN, de acordo com o método descrito por van Soolingen et al (1994). As amostras foram inoculadas em meio líquido TSB contendo NaCl 5%, e cerca de 1 mL de cultura foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. O conteúdo foi centrifugado a 5000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o material foi ressuspendido em 400 µL de tampão TE. A seguir, foi adicionado 12 µL de lisozima (20 mg/ mL), e incubado por 1h e 30 min a 37ºC. Após o início da lise, foi acrescentado 70 µL de SDS (10%) e 12 µL de proteinase K (20 mg/ mL), e novamente o sistema foi incubado, agora a 56ºC por 10 min. Terminada a incubação, foram adicionados 100 µL de NaCl 5,0 M e 80 µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB e 0,73 M NaCl). A solução foi homogeneizada até atingir um aspecto leitoso. Uma última incubação foi realizada a 65ºC por 10 min. A extração com clorofórmio ocorreu pela adição de volume igual de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1, v/v), seguida de agitação por 30 segundos. Realizou-se uma segunda centrifugação de 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e incubação a – 20ºC por 30 min. Uma centrifugação final de 10.000 g a 4ºC por 20 min, seguida de uma lavagem do sedimento com 1 mL de álcool etílico a 70%. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de água miliQ. O ácido nucléico foi estocado a – 20ºC. A extração de DNA foi realizada uma única vez para todas as análises do PCR.

3.5.2 PCR – *mec*A

Para identificar a presença do gene *mec*A nas cepas de SCoN, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se 2 µL do DNA extraído de cada amostra. A PCR foi preparada com um volume final de 30 µL por amostra, contendo 3 µL de tampão 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,6 µM de cada oligonucleotídeo iniciador para o gene *mec*A (Geha et al., 1994), 0,2 mM de dNTPs e 1 U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen®). Foi utilizado o termociclador da marca Biocycler®. Inicialmente, um ciclo de 92ºC por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 50 segundos, 52 ºC por 1 min

e 72 ºC por 1 min. O processo foi finalizado com um ciclo de 72ºC por 5 min. A avaliação da amplificação do gene *mec*A foi feita pela eletroforese em gel de agarose a 1,0% (Invitrogen®) em tampão TBE com brometo de etídio a 0,5 µg/ mL. Dez µL do produto de PCR com 2 µL de tampão de amostra 5X foram aplicados no gel. Após a eletroforese, o gel foi analisado em um transiluminador (UV) e fotografado. A realização do PCR – *mec*A foi para todos os isolados de SCoN deste estudo.

3.5.3 ITS – PCR

A identificação das espécies de SCoN foi feita pela técnica *Internal Transcribed Spacer* – PCR (ITS-PCR), de acordo com método descrito por Jensen et al (1993) e revisado por Couto et al (2001). Utilizou-se 2 µL do DNA extraído de cada amostra. A PCR foi preparada com um volume final de 30 µL por amostra, contendo 3 µL de tampão 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,6 µM de cada oligonucleotídeo iniciador para ITS (Jensen 1993), 0,2 mM de dNTPs e 1 U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen®). Foi utilizado o termociclador da marca Biocycler®. Inicialmente, um ciclo de 94ºC por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 4 min, 2 min *ramp* até 72ºC e 2 min a 72ºC. O processo foi finalizado com um ciclo de 72ºC por 7 min. A avaliação da amplificação do ITS-PCR foi feita pela eletroforese em gel de agarose a 2,0% (Invitrogen®) em tampão TBE com brometo de etídio a 0,5 µg/ mL. Dez µL do produto de PCR com 2 µL de tampão de amostra 5X foram aplicados no gel. Após a eletroforese, o gel foi analisado em um transiluminador (UV) e fotografado. Foram utilizadas cepas padrão para controle e identificação, que foram as seguintes: DEN125-*S. epidermidis*, ICE145-*S. haemolyticus*, DEN157-*S. warneri*, ICE187-*S. lugdunensis*, DEN177-*S. saprophyticus*, COB-25-*S. caprae*, ITL152-*S. cohnii*, AGT121-*S. simulans* e TAW88-*S. carnosus*, cedidas gentilmente pela profª Drª Hermínia de Lencastre, do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal. A interpretação do gel foi realizada por comparação dos perfis de bandas obtidos entre as amostras analisadas e cepas padrão.

3.5.4. Identificação do cassete cromossomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

Para identificar o tipo de cassete cromossomal estafilocócico *mec* nas cepas de SCoN, foi utilizada a técnica Multiplex – PCR, descrito por Oliveira et al (2002) e revisado por Milheiriço et al (2007). Utilizou-se 2 µL do DNA extraído de cada amostra. Os *primers* utilizados para o Multiplex foram: CIF2 (tipo I), *ccr*C (tipo V), RIF5 (tipo III), SCCmecV (tipo V), dcs (tipo I, II, IV e VI), *ccr*B2 (tipo II e IV), kdp (tipo II), SCCmecIII (tipo III), mecI (tipo II e III) e mecA (controle interno da reação).

A PCR foi preparada com um volume final de 30 µL por amostra, contendo 3,0 µL de tampão 10x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 3,0 µM de uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada tipo de SCC*mec*, 0,2 mM de dNTPs e 1 U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen®). A tabela I mostra a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Para a realização dos testes, foi utilizado o termociclador da marca Biocycler®. Inicialmente, um ciclo de 94ºC por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 53ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 min. O processo foi finalizado com um ciclo de 72ºC por 4 min. A avaliação da amplificação do produto foi feita pela eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE com brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Dez µL do produto de PCR com 2 µL de tampão de amostra 5x foram aplicados no gel. Após a eletroforese, o gel foi analisado em um transiluminador (UV) e fotografado. Foram utilizadas cepas controle COL (tipo I), HPV 107 (tipo Ia), BK 2464 (tipo II), ANS 46 (tipo III) e MW 2 (tipo IVa) cedidas gentilmente pela profª Drª Hermínia de Lencastre, do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal. Essas cepas auxiliaram na determinação dos padrões de SCC*mec* na corrida eletroforética.

Tabela II – Sequência de *primers* utilizados para o SCC*mec* PCR Multiplex.

Nome do *primer*	Tamanho do *primer* (5'→3')	Especificidade do *primer* (tipo SCC*mec*, região)	Tamanho da amplificação (pb)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	I, região J1	495
ccrC F2 ccrC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	V, complexo *ccr*	449
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG ATGGAGATGAATTACAAGGG	III, região J3	414
SCCmec V J1 F SCCmec V J1 R	TTCTCCATTCTTGTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	V, região J1	377
dcs F2 dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	I, II, IV e VI, região J3	342
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	II e IV, complexo *ccr*	311
kdp F1 kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	II, região J1	284
SCCmec III J1 F SCCmec III J1 R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	III, região J1	243
mecI P2 mecI P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACTTGTC	II e III, complexo *mec*	209
mecA P4 mecA P7	TCCAGATTACAACTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	controle interno positivo	162

Fonte: Adaptado de Milheiriço et al (Milheiriço et al., 2007).

3.5.5 *Pulsed field gel electrophoresis* – PFGE

Para fazer a análise da similaridade genética dos isolados, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE), segundo o protocolo descrito por Chung et al (2000), com algumas modificações. (i) Preparação das células: foi retirada uma colônia de cada isolado de SCoN e inoculada em 5,0 mL de TSB, incubando a 37ºC por 16 h. Em seguida, foi realizada a centrifugação de 500 µL do cultivo a 14.000 rpm durante 2 min a 4ºC. O sedimento foi ressuspendido em 500 µL de tampão de suspensão PIV (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1M de NaCl,) e novamente centrifugado. Após a ressuspensão em PIV, foi realizada a padronização do inóculo em espectrofotômetro a 620_{nm}. Os "plugs" foram preparados com 150 µL de suspensão de bactérias e o mesmo volume de agarose "low melting point" a 2%. (ii) Lise celular: as células dos "plugs" foram lisadas em tampão de lise EC

(6 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1M NaCl, 100 mM EDTA, 0,2% desoxicolato de Na, 0,5% sarcosil) adicionado de RNAse (50 µg/mL), lisostafina (100 µg/mL) e lisozima (50 µg/mL) por 5h a 37ºC. Em seguida, foi realizada desproteinização com incubação dos "plugs" em tampão ES (0,5M EDTA, 1% sarcosil) com proteinase K (1mg/mL) a 50ºC por pelo menos 17 h. Após a incubação, os "plugs" foram lavados cinco vezes em tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 7, 1,0 mM EDTA, pH 8,0). (iii) Digestão do DNA: os plugs foram digeridos com 20 U de endonuclease de restrição *Sma*I (Invitrogen®) em 100 µL de tampão de enzima a 25ºC durante a noite. (iv) Separação dos fragmentos de restrição: os fragmentos de DNA digeridos foram separados por corrida em gel de agarose 1% (Sigma®) e tampão TBE 0,5X (Tris 0,5 M borato EDTA). Foi usado o marcador de peso molecular lambda (Bio-Rad®) e também uma cepa controle em cada gel. A eletroforese foi realizada no aparelho CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) nas seguintes condições: voltagem 6 V/cm, tempo 23 h, temperatura de 11,3º C, pulso inicial de 5s e final de 35s. Após a eletroforese, o gel foi corado por 10 minutos com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) e fotografado em aparelho fotodocumentador (BioRad®). (v) Interpretação de resultados: foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos por Tenover (Tenover 1995) e por análise computadorizada (BioNumerics, v 5.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O critério de escolha dos isolados foi realizado com cepas da mesma espécie isoladas e identificadas tanto na admissão quanto na alta.

4. Resultados

Dos 429 neonatos admitidos na UTI neonatal do Hospital da Criança, 392 (91,4%) foram coletados swabs nasais, no momento da admissão e alta. A Figura 3 mostra o fluxograma dos swabs coletados que foram isolados SCoN entre os neonatos. A prevalência de portador durante a hospitalização foi de 67,1% (95% IC 62,5-71,6), obtendo-se 245 isolados. No momento da admissão, a prevalência de neonatos portadores de SCoN durante a internação na UTI foi de 14,1% (95% IC 10,9-17,9) obtendo-se 58 isolados; destes, oito não puderam ser recuperadas (total de 50 isolados admissão). A incidência de SCoN na coorte dos neonatos durante o período de hospitalização foi de 56,1% (95% IC 51,1-61,1), obtendo 220 amostras; destas, 20 não

puderam ser recuperadas (6,1%). O tempo médio de hospitalização entre os neonatos foi de 15,8 dias.

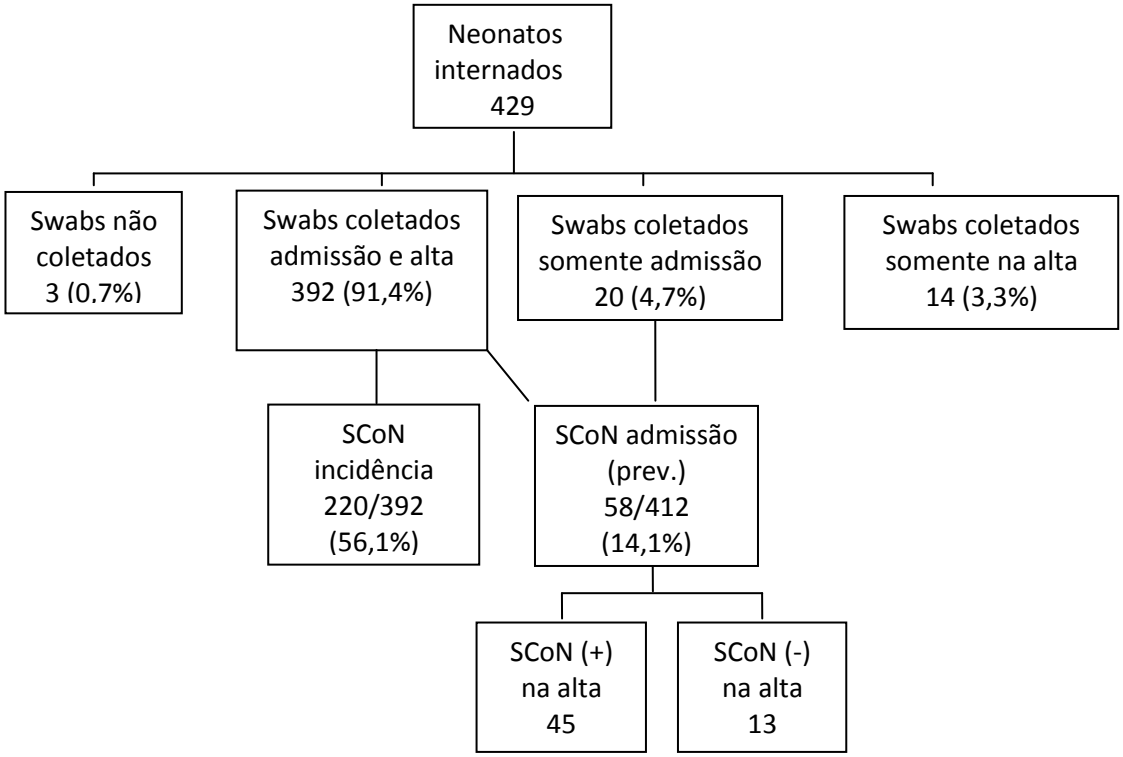

Figura 3 – Fluxograma dos swabs coletados e dos SCoN isolados de neonatos admitidos na UTI neonatal em um hospital no município de Goiânia durante jul/2007 a mai/2008.

A prevalência de resistência aos β-lactâmicos (cefoxitina e oxacilina) entre os neonatos no momento admissão foi de 58,0% (29/50). Três neonatos (6%), também na admissão, foram identificados como portadores de SCoN multiresistentes, ou seja, resistentes à oxacilina, cefoxitina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim. Somente um neonato (dois isolados) apresentou o fenótipo de resistência MLSB. A resistência aos β-lactâmicos no momento da alta foi consideravelmente elevada, com 91,8% (225/245). Somente um neonato também apresentou o fenótipo MLSB no momento da alta. Observou-se um mesmo perfil de multiresistência dos isolados de SCoN na admissão, porém a frequência de neonatos apresentando cepas multiresistentes no momento da alta foi 42,0% (103/245). Foi identificado um isolado resistente à vancomicina e outros três com resistência intermediária à teicoplanina pelo método de disco difusão. A Figura 4 demonstra um

comparativo do perfil de resistência entre os isolados microbianos nos momentos de admissão e alta. A Figura 5 ilustra uma placa de antibiograma pelo método de disco difusão, com uma cepa multiresistente aos antimicrobianos citados.

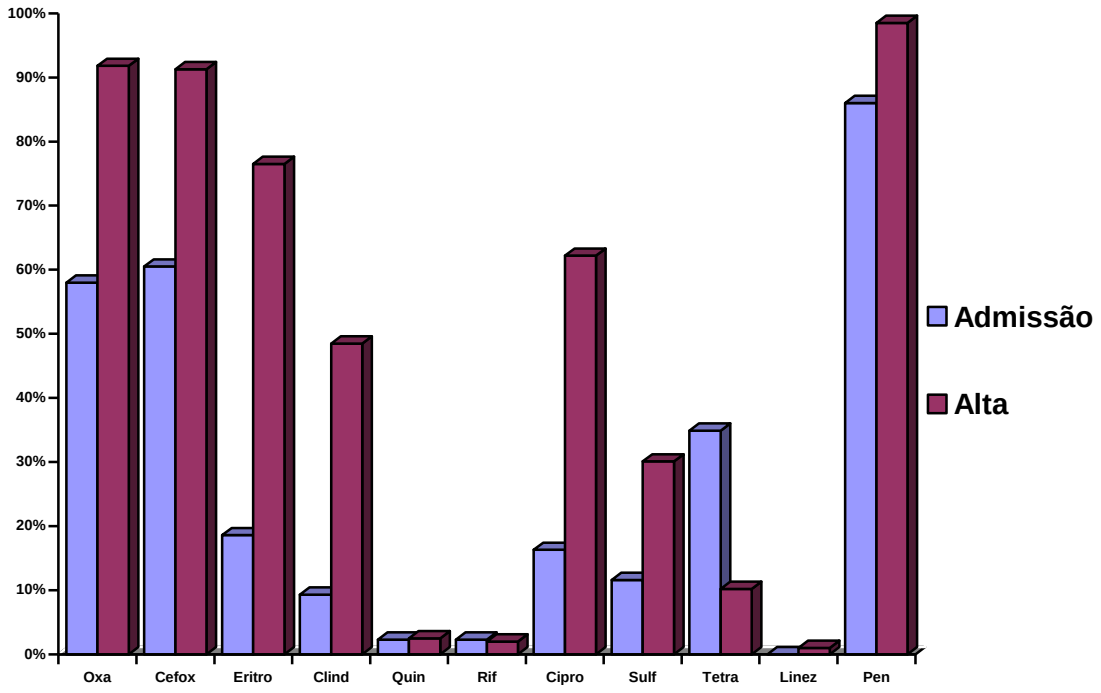

Figura 4 – Frequência de resistência aos antimicrobianos testados dos SCoN isolados das narinas de neonatos atendidos na UTI neonatal de um Hospital em Goiânia, durante mai/2007 a jun/2008 nos momentos de admissão e alta.

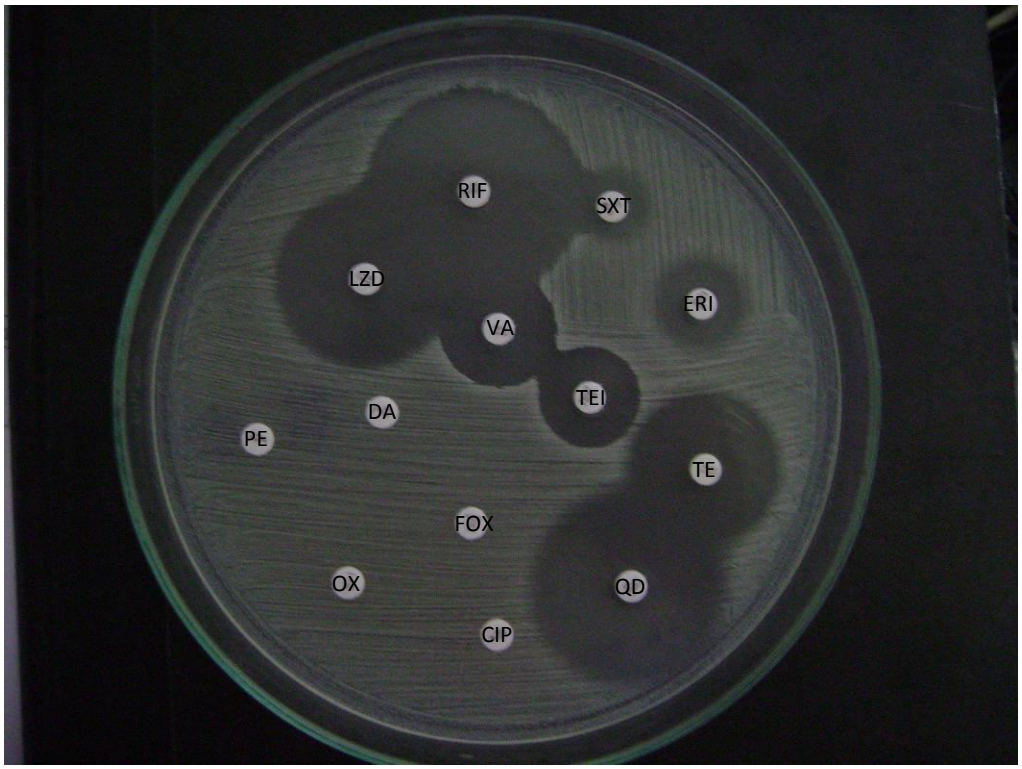

Figura 5 – Antibiograma representativo de uma cepa de SCoN resistente a vários antimicrobianos.

A identificação das espécies de SCoN foi realizada pela da técnica de ITS – PCR, segundo Couto et al (2001). Na tabela II estão descritas as espécies identificadas. Dentre os isolados na admissão, os mais prevalentes foram *S. epidermidis* (36%) e *S. haemolyticus* (32%). Dos isolados no momento da alta, os mais prevalentes foram *S. haemolyticus* (39,2%) e *S. epidermidis* (38,8%). A Figura 6 mostra uma corrida eletroforética com os produtos de amplificação da ITS – PCR de alguns isolados. Não foi possível caracterizar 24 isolados de SCoN.

Tabela III – Espécies identificadas entre os neonatos colonizados por SCoN um uma UTI neonatal no município de Goiânia.

Espécies – admissão	Espécies – alta
S. epidermidis – 18/50 (36%)	*S. epidermidis* – 95/245 (38,8%)
S. haemolyticus – 16/50 (32%)	*S. haemolyticus* – 96/245 (39,2%)
S. warneri – 7/50 (14%)	*S. warneri* – 9/245 (3,7%)
S. capitis – 0/50	*S. capitis* – 17/245 (6,9%)
S. schleiferi – 1/50 (2%)	*S. schleiferi* – 2/245 (0,8%)
Outros – 2/50 (4%)	Outros – 8/200 (3,3%)
Sem padrão – 6/50 (12%)	Sem padrão – 18/245 (7,3%)
Total – 50 (100%)	**Total – 245 (100%)**

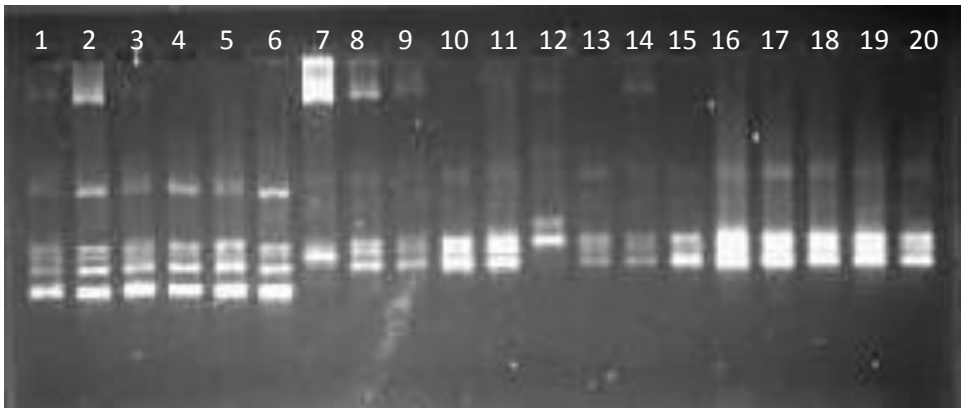

Figura 6 – Eletroforese em agarose do produto de amplificação da ITS – PCR. Posição 1 (C+ *S. epidermidis*); posição 8 (C+ *S. haemolyticus*); posições 2, 3, 4, 5 e 6 isolados com perfil semelhante a *S. epidermidis*; posições 9, 10, 11, 13, ao 20 isolados com perfil semelhante a *S. haemolyticus*. As amostras das posições 7 e 12 são de outras espécies.

Dentre os SCoN isolados na admissão, o gene *mec*A foi identificado em 60% dos casos, enquanto no momento da alta, a sua presença foi bem superior, sendo positivo em 82,9%. A Figura 7 mostra uma corrida eletroforética de algumas amostras cujos produtos foram amplificados para o gene *mec*A. Dentre os SCoN que foram positivos para o gene *mec*A, realizou-se a técnica do SCC*mec* multiplex PCR. A frequência de *SCCmec* identificada na admissão é semelhante ao da alta, sendo os tipos I e IV os mais prevalentes. Devido a uma grande variabilidade presente no cassete cromossomal estafilocócico dos SCoN, foi identificado mais de um sub-tipo de SCC*mec*, sendo quase que a metade dos produtos amplificados (43,2% na admissão e 46,8% na alta). Na Tabela III mostra os tipos de SCC*mec* observados entre os isolados de SCoN na UTI neonatal, informando o perfil das cepas circulantes no ambiente nosocomial, e na Tabela IV a caracterização fenotípica da resistência à oxacilina e identificação genotípica dos SCoN isolados na admissão e na alta hospitalar, mostrando uma diferença muito significante entre os grupos analisados.

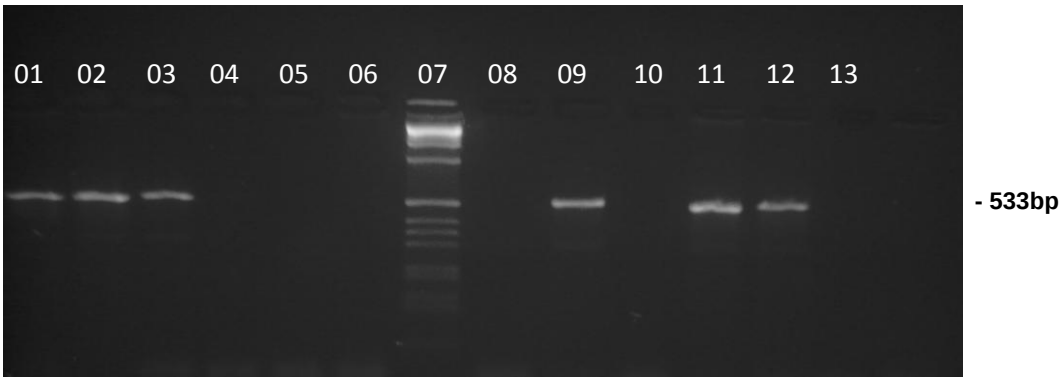

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do gene *mec*A dos isolados de SCoN, pela técnica de PCR; Posições 01, 02, 03, 09, 11 e 12 são amostras positivas; posições 04, 05, 06, 08 e 10 correspondem a amostras que não possuem o gene; posição 13, controle negativo; posição 07, marcador 50pb.

A análise de similaridade genética pelo PFGE foi avaliada para as espécies mais prevalentes (*S. epidermidis* e *S. haemolyticus*) identificadas entre os pacientes no momento da alta e admissão. O dendrograma obtido da corrida do gel mostrou uma grande variabilidade genética entre as cepas da mesma espécie, o que sugere uma alta

diversidade de microrganismos no ambiente hospitalar. As Figuras 8 e 9 mostram os dendrogramas de cepas pares de *S. epidermidis* e de *S. haemolyticus*, respectivamente, indicando também o tipo de *SCCmec* dos isolados e o tempo de internação de cada paciente. Essa grande variação entre os microrganismos reflete a grande capacidade de veiculação no ambiente nosocomial desses patógenos.

Os isolados que apresentaram o mesmo perfil genético, ou seja, semelhança de 100% foram considerados geneticamente idênticos, sendo denominados *clones.* Já aqueles que apresentaram uma semelhança maior ou igual a 80% foram considerados como pertencentes ao mesmo *cluster*, segundo Tenover et al (1997). Somente três pacientes apresentaram isolados com o mesmo perfil genético (*clones*) na admissão e alta. Dois pacientes apresentaram isolados pertencentes ao mesmo *cluster*, mostrando alta similaridade entre as cepas (amostra 779 e 585 de *S. haemolyticus*).

A Tabela V descreve as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes hospitalizados que participaram do estudo. O único fator de risco estatisticamente significante foi o uso de CPAP (pressão aérea contínua). Outros fatores como uso prévio de antimicrobianos, sonda nasogástrica e tipo de parto não apresentaram relevância estatística em nosso trabalho.

Tabela IV – Tipos de *SCCmec* identificados entre os isolados de SCoN na UTI neonatal, durante o período de jul/2007 a mai/2008.

	Admissão		**Alta**	
	N=50	(100%)	N=245	(100%)
SCC*mec*				
I	8	(26,7%)	72	(35,5%)
II	1	(3,4%)	2	(1,0%)
III	1	(3,4%)	8	(3,9%)
IV	2	(6,7%)	12	(5,9%)
V	1	(3,4%)	2	(1,0%)
Mais de 1 tipo	13	(43,2%)	95	(46,8%)
Não tivável	4	(13,2%)	12	(5,9%)

Tabela V – Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de SCoN isoladas durante o período de internação de neonatos em uma UTI neonatal durante o período de jun/2007 a mai/2008 na cidade de Goiânia.

	Admissão		Alta		RR	IC 95%	*p*
	N=50	(100%)	N=245	(100%)			
Fenótipo (Antib.)							
OXA R	29	(58%)	225	(91,8%)	8,15	3,72 – 17,93	<0,001
OXA S	21	(42%)	20	(8,2%)			
MDR	3	(6%)	103	(42%)	11,36	3,28 – 47,09	<0,001
Não MDR	47	(94%)	147	(58%)			
Genótipo							
***mec*A**							
Positivo	30	(60%)	203	(82,9%)	3,22	1,59 – 6,53	=0,0003
Negativo	20	(40%)	42	(17,1%)			

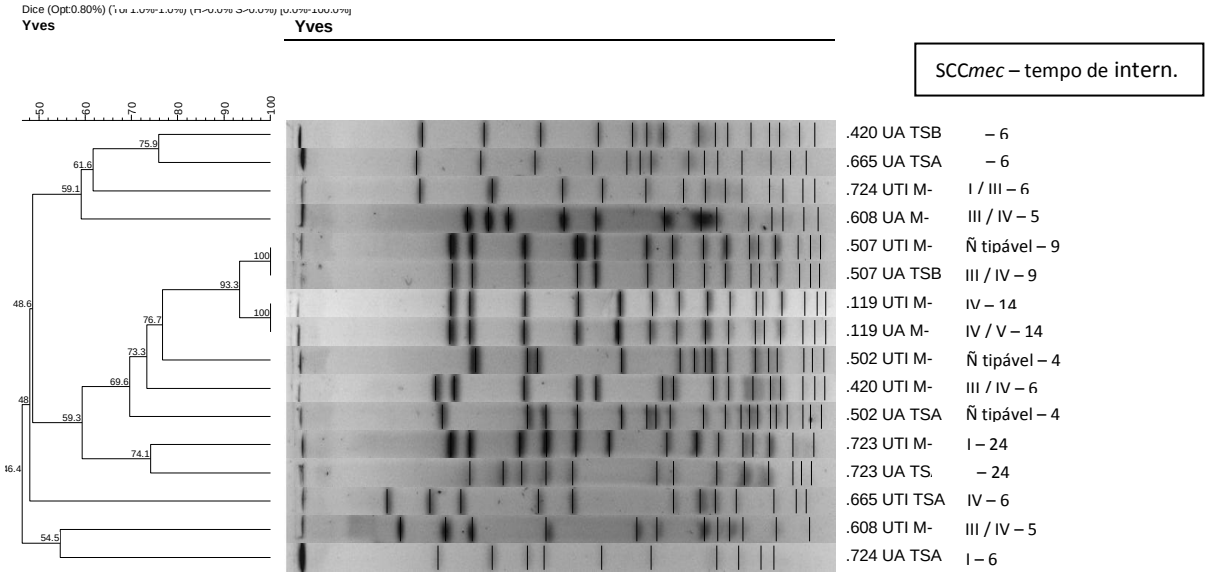

Figura 8 – Dendrograma dos isolados na admissão e alta de *S. epidermidis*.

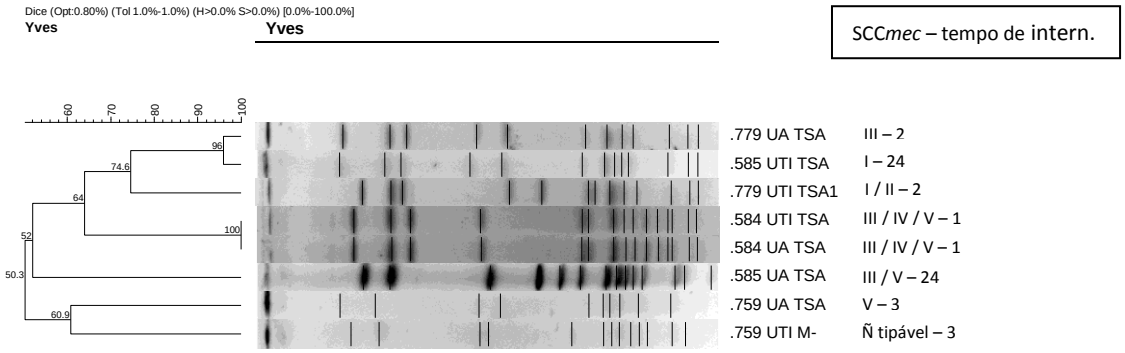

Figura 9 – Dendrograma dos isolados na admissão e alta de *S. haemolyticus*.

Tabela VI – Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes hospitalizados durante o período de jul/2007 a mai/2008 em uma UTI neonatal em Goiânia.

	Casos incidentes de SCoN		TOTAL DE CASOS		**RR**	**IC 95%**	**P**
	n	%	n	%			
Sexo							
Masculino	138	62,7	230	58,8	1,18	0,98 – 1,42	0,756
Feminino	82	37,3	161	41,2			
Antibiótico durante a internação							
Sim	178	82,0	311	80,6	1,10	0,87 – 1,4	0,412
Não	39	18,0	75	19,4			
GR Idade de Internação							
<24hs	170	77,3	296	75,5	1,10	0,89 – 1,37	0,359
>=24hs	50	22,7	96	24,5			
Intubação							
Sim	82	37,4	159	40,8	0,87	0,72 – 1,05	0,130
Não	137	62,6	231	59,2			
CPAP							
Sim	91	41,6	140	35,9	1,27	1,07 – 1,51	0,008
Não	113	59,2	232	65,7			
CPAP ou intubado							
Sim	129	58,9	223	57,2	1,07	0,90 – 1,28	0,436
Não	84	43,8	161	45,4			
Nutrição parenteral							
Sim	1	0,5	3	0,8	0,59	0,12 – 2,94	0,424
Não	218	99,5	387	99,2			
Nutrição enteral							
Sim	3	1,4	4	1,0	1,34	0,75 – 2,37	0,449
Não	216	98,6	385	99,0			
Sonda nasogástrica							
Sim	25	11,8	38	10,2	1,18	0,92 – 1,52	0,226
Não	186	88,2	335	89,8			
Prematuro < 37 semanas							
Sim	136	62,1	244	62,6	0,98	0,82 – 1,17	0,830

Não	83	37,9	146	37,4			
Baixo peso ao nascer < 2500g							
Sim	111	50,7	207	53,1	0,91	0,76 – 1,08	0,284
Não	108	49,3	183	46,9			
Tipo de parto							
Vaginal	69	31,5	129	33,1	0,93	0,77 – 1,13	0,456
Cesáreo	150	68,5	261	66,9			
Gestação múltipla							
Sim	15	6,9	25	6,4	1,08	0,77 – 1,5	0,671
Não	202	93,1	363	93,6			

5. Discussão

O número de crianças colonizadas por SCoN observado neste estudo foi bastante elevado, o que resultou em uma prevalência na admissão de 14,1% e uma incidência de 56,1%. Dados semelhantes foram encontrados por Campeotto et al (2004), que analisaram a colonização nasal e retal de pacientes na UTI neonatal, identificando uma frequência de 66,1% de SCoN, com elevado índice de resistência antimicrobiana. A literatura apresenta poucos dados sobre colonização nasal em neonatos hospitalizados.

O número de isolados de *S. epidermidis* entre os SCoN é maior entre as infecções de corrente sanguínea e colonização (Miragaia et al., 2007; Blum-Menezes et al., 2009). Em nosso trabalho, fazendo um paralelo, encontramos também uma maior frequência de *S. epidermidis* entre isolados na admissão, seguido de *S. haemolyticus*, correspondendo estas duas espécies a praticamente 70% dos isolados identificados entre os pares avaliados. Em um grande estudo realizado na África, Aires de Sousa et al (2000) observaram frequência de colonização por SCoN em pacientes hospitalizados e profissionais de saúde semelhantes. Já para os isolados identificados no momento da alta, observou-se uma inversão, sendo *S. haemolyticus* o mais isolado (38,8%), seguido de *S. epidermidis* (34,3%). Isto pode estar relacionado com a habilidade dos *S. haemolyticus* de se adaptarem ao meio (genes de resistência bacteriana, biocidas entre outros) e serem potenciais agentes infecciosos, principalmente em imunocomprometidos.

De fato, Ben Saida et al (2009), em um estudo de vigilância, coletaram amostras de neonatos, enfermeiras e garrafas de desinfetantes, identificando clones de *S.*

haemolyticus entre os neonatos, e um mesmo tipo endêmico identificado nas enfermeiras e nos desinfetantes. Com isso, a persistência no ambiente de *S. haemolyticus* é grande, sendo resistente inclusive a desinfetantes utilizados na limpeza da unidade. Segundo o autor, o gene *qac*A/B foi encontrado somente nos clones resistentes aos desinfetantes. Este gene confere resistência a biocidas. Além disso, auxiliam na remoção de elementos internos para fora da célula, como bombas de efluxo na resistência antimicrobiana (tetraciclinas em *Escherichia coli*), e possuem grande capacidade de transferência entre cepas semelhantes (ANVISA, 2007; Correa et al., 2008).

A correta identificação das espécies de SCoN é muito importante pois permite um melhor entendimento da etiopatogenia, buscando uma melhor conduta de tratamento frente aos fatores de risco associados. Assim, a técnica de ITS-PCR, é uma ferramenta molecular que apresenta boa reprodutibilidade, rapidez e confiabilidade quando comparada com métodos fenotípicos. É amplamente usada por outros pesquisadores, realizando modificações de acordo com seus critérios. Saruta et al (1997) realizaram um novo desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a região 16S-23S rRNA utilizando a técnica de *nested* PCR, obtendo uma nova ferramenta na identificação de espécies estafilocócicas.

A importância na aplicação de novos métodos diagnósticos mais específicos se torna necessária no cenário atual, no qual o rigor científico é primordial. Isto pode ser demonstrado por Kawamura et al (1998), onde identificaram de forma correta somente 74% de isolados de estafilococos por testes bioquímicos (métodos e kits comerciais). Entretanto, Iorio et al (2007) descreveram que métodos simplificados são muito eficientes na identificação de espécies estafilocócicas frente a métodos automatizados, reforçando o poder destas técnicas no laboratório clínico de rotina.

Em nosso estudo foi verificado um grande número de isolados multiresistentes aos antimicrobianos. Isto pode ser devido a uma resposta à pressão seletiva gerada pela quimioterapia antimicrobiana e a introdução de novos agentes antibacterianos, característicos de ambientes hospitalares, promovendo um quadro de dimensões globais e um grave problema de saúde pública (Rossolini and Mantengoli, 2008). Deve ser levada em consideração a avaliação da resistência aos glicopepítdeos, que em nosso trabalho os resultados não podem ser fielmente correlacionados, devido somente a

utilização do método de disco difusão (Bauer et al., 1966) que, segundo o CLSI (2009), deve-se determinar o MIC dos isolados para definir algum nível de resistência. Este método escolhido foi devido a sua boa reprodutibilidade e menor custo.

Além da determinação do MIC, a biologia molecular (amplificação do gene *van*) podem melhor caracterizar tal resistência. Porém em outros trabalhos, com um número maior de isolados de corrente sanguínea e técnicas específicas, foi demonstrada uma sensibilidade reduzida aos glicopeptideos entre os SCoN (Tabe et al., 2001; Natoli et al., 2009).

A determinação e conhecimento do perfil de resistência dos microrganismos circulantes possuem grande relevância na rotina terapêutica, pois poderá auxiliar o clínico na escolha mais adequada da terapia empírica, caso necessário. Um perfil de multiresistência pode estar associado a uma falha em tratamentos anteriores. Não foi observado nenhum isolado resistente à linezolida. Neste sentido, existem vários trabalhos que avaliaram as vantagens no uso da linezolida no tratamento de infecções por Gram positivos multiresistentes. Em comparação com os glicopeptideos, este antimicrobiano possui um melhor custo benefício (Grau and Rubio-Terres, 2008; Herrmann et al., 2008). Assim, fazendo uso de terapias alternativas, pode-se diminuir a possibilidade de desenvolvimento de resistência reduzida aos glicopeptideos. Mas toda terapia empírica, independente do fármaco, deve ser prescrita com muita cautela, devendo-se levar em conta todos os processos de internação, como custos e qualidade no tratamento (Milkovich, 2009).

A resistência antimicrobiana aos β-lactâmicos (oxacilina / cefoxitina) é conferida principalmente pela presença do gene *mec*A. Dentre os isolados de SCoN, foi detectada uma prevalência elevada deste gene. Na análise dos isolados na admissão, foi identificada uma resistência de 60%, e a na análise entre os isolados de SCoN na alta, foi identificada a presença do gene *mec*A em 82,9%. Hira et al (2007) fizeram a caracterização molecular de SCoN identificados na corrente sanguínea de neonatos, encontrando o gene *mec*A em 87,0% dos isolados, dados de isolados semelhantes a este trabalho. Outros autores também obtiveram resultados semelhantes, como Krediet et al (2001) que identificaram uma prevalência elevada de resistência antimicrobiana entre os isolados de SCoN de sepse em neonatos. Esta condição pode sugerir que o perfil de

resistência está diretamente relacionado com a pressão seletiva antimicrobiana, devido principalmente à profilaxia antibacteriana realizada nesses pacientes (Saiman, 2006).

Foi avaliada a presença do SCC*mec* entre os isolados portadores do gene *mec*A. Este cassete cromossomal possui uma grande variabilidade genética entre os SCoN de diferentes espécies, apresentando uma grande proporção de elementos não tipáveis, quando comparado aos identificados em MRSA (Jamaluddin et al., 2008). Devido a esta variabilidade genética presente no cassete cromossomal estafilocócico, 16 isolados de SCoN não puderam ser identificados, além de apresentar uma alta variabilidade de sub-tipos de SCC*mec*. Dados estes que foram demonstrados por Zhang et al (2009), que encontraram uma alta frequência de isolados de SCoN não tipáveis pelo SCC*mec*, possuindo estruturas atípicas dos padrões já determinados, ou seja, SCoN com mais de um tipo de SCC*mec*. Em outro trabalho, Ibrahem et al (2009) identificaram a colonização por estafilococcos em estudantes residentes. Desses, 88% foram isolados SCoN e 61% possuíam o gene *mec*A, sendo que a maioria (33%) dos isolados pertenciam ao SCC*mec* tipo IV, seguidos de 18% com SCC*mec* tipo V.

A presença do cassete cromossomal (SCC*mec*) em espécies estafilocócicas se tornou evidente nos últimos anos, principalmente no ambiente nosocomial (Deurenberg and Stobberingh, 2009). O SCoN possui grande capacidade de transferir esse elemento genético para *S. aureus*, originando novos microrganismos multiresistentes (MRSA), por acreditar-se que possuem origem em comum (Chlebowicz et al., 2009). Mesmo assim, alguns novos elementos estão presente somente entre os SCoN (Garza-Gonzalez et al., 2009).

Diversas técnicas moleculares para *S. aureus* já foram padronizadas e possuem boa reprodutibilidade, entretanto isso não ocorre entre os SCoN, devido a grande variabilidade genética identificada entre as espécies e também ao fato do desinteresse ao seu estudo, por ser no passado considerado apenas como microrganismo comensal. Devido a esta deficiência na identificação de espécies de SCoN e o uso de metodologias não padronizadas para detecção de resistência à meticilina (entre elas o SCC*mec*), tem proporcionado na literatura diversos dados errôneos a respeito do assunto (Garza-Gonzalez et al., 2009).

Infecções no ambiente neonatal se tornaram comum nos últimos anos, estando relacionadas a diversos fatores como a grande debilidade física e imunológica dos

pacientes, além de serem submetidos a procedimentos invasivos e a diversas medicações (antibioticoterapia empírica), foi o que concluiu Saiman (2006). Segundo o autor, como os SCoN estão constantemente presente em infecções nosocomiais, diversas medidas, se forem aplicadas efetivamente, podem reduzir os índices de sepses nosocomiais, com a melhoria na qualidade dos serviços, aumentando a aderência à higienização das mãos pelos profissionais e melhoras nas práticas de inserção de CVC e de manutenção promovendo um decréscimo considerável nas taxas de infecções hospitalares.

Na avaliação da similaridade genética entre os isolados, houve grande diversidade entre os SCoN dentre as espécies mais prevalentes, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*. Klingenberg et al (2007) avaliaram a semelhança de 180 isolados de SCoN em hemoculturas de neonatos, demonstrando a existência de 2 grandes clones endêmicos na unidade. A amostragem maior nesse trabalho associada a outro sítio corpóreo (sangue) pode ilustrar essa diferença entre os resultados dos autores com esse trabalho. Como foi avaliado o perfil de colonização, a troca de microrganismos é muito grande e constante. Outros trabalhos demonstram uma variabilidade genética maior entre os SCoN em hemoculturas (Ben Saida et al., 2006).

Identificamos três pacientes que apresentaram o mesmo perfil genético (clones) dos isolados em ambos os momentos (admissão e alta), com perfis de resistência aos antimicrobianos semelhantes, entretanto para um deles (paciente 584 – *S. haemolyticus*), a hospitalização foi somente de um dia, o que sugere ser o mesmo microrganismo. Já os outros dois pacientes internados que apresentaram 100% de similaridade genética, ficaram 9 e 14 dias internados. Foi identificado também dois *clusters* (uma de *S. epidermidis* e um de *S. haemolyticus*), não existindo uma proximidade temporal entre as internações destes pacientes. Com isso, podemos verificar uma persistência de colonização dos SCoN, pois estes microrganismos possuem várias características de adaptação e sobrevivência ao meio (Klingenberg et al., 2007).

Pela técnica de PFGE foi possível identificar que, entre os pacientes hospitalizados, ocorreu uma grande troca de microrganismos durante a internação, mesmo aqueles da mesma espécie. Assim, neonatos que são internados em UTI neonatal possuem grandes chances de serem colonizados por cepas hospitalares

(multiresistentes), e o uso de diversos procedimentos como CPAP, favorece ainda mais para este estado de colonização.

No ambiente da UTI neonatal ocorre um grande fluxo de pessoas, tanto de profissionais quanto de mães dos neonatos. Isto pode explicar a grande diversidade genética dos isolados identificados, pois estes microrganismos estão em constante mudança neste ambiente nosocomial, mas também foi identificado um *cluster* entre pacientes diferentes, o que, como dito anteriormente, sugere uma persistência do microrganismo no ambiente, podendo esta colonização ter ocorrido principalmente com o profissional de saúde servindo como carreador, transferência horizontal. A capacidade dos SCoN de se adaptarem ao ambiente está relacionada a diversos fatores, como resistência antimicrobiana, formação de biofilme, proteínas de superfície com propriedades de aderência, entre outros (Klingenberg et al., 2007).

Como foi possível realizar uma vigilância durante todo período de internação dos neonatos hospitalizados na UTI neonatal, conseguimos avaliar o perfil dos isolados que colonizam essas crianças. Os isolados de SCoN identificados na admissão (n=50) apresentaram um perfil de resistência bastante inferior do que aqueles isolados de SCoN no momento da alta (n=245). A elevada resistência aos β-lactâmicos (91,8%) e MDR (42%) no momento da alta sugere que o ambiente nosocomial é um reservatório de resistência antimicrobiana. Como os SCoN apresentam os maiores índices de infecções no ambiente nosocomial, o tratamento adequado desses patógenos representa uma melhor sobrevida para esses pacientes (Venkatesh et al., 2006).

Dentre os fatores de risco avaliados, o único que apresentou significância estatística foi o uso de CPAP (p=0,008). Já aqueles que poderiam ser bastante relevantes como antibiótico durante a internação, intubação, nutrição enteral, sonda nasogástrica e tipo de parto, não apresentaram relevância estatística em nosso estudo. Poucos dados na literatura demonstram a relação destes fatores associados a infecções. Com isso, fazendo um paralelo com dados direcionados a infecção, associando diversos fatores, revelou-se que crianças prematuras e longo período de internação são condições que aumentam as chances para sepses por SCoN (Hira et al., 2007). O uso de CPAP em nosso trabalho foi um fator associado à colonização por SCoN. Ronnestad et al (2005) identificaram uma associação no uso CPAP em infecções por microrganismos nosocomiais, dentre eles os SCoN.

Alguns trabalhos, menos recentes, mostram também que cepas de SCoN colonizavam e causavam doenças em pacientes hospitalizados na UTI neonatal, durante longos períodos de estudo (Low et al., 1992; Huebner et al., 1994). Podemos concluir que o estado de portador de SCoN MDR pode estar associado com a grande capacidade de persistência desses microrganismos no ambiente nosocomial, dificultando assim a sua relação com qualquer fator de risco mencionado anteriormente.

O grande impacto que a colonização por SCoN apresenta para o neonato é a sua capacidade de invasão (dependendo da espécie), e consequentemente podendo promover um quadro infeccioso invasivo. A sepse neonatal pode aumentar a resposta inflamatória no organismo, e devido aos diversos fatores de virulência que o microrganismo pode possuir (biofilme, multiresistência), estes fatores podem limitar a resposta imune do paciente, sendo que esses neonatos muitas vezes já apresentam uma condição de imunodepressão (Klingenberg et al., 2005).

A UTI neonatal representa um ambiente rico para aquisição de cepas de SCoN colonizadoras multiresistentes, o que pode aumentar o risco de infecções invasivas por SCoN multiresistentes. Esses neonatos ao saírem da UTI neonatal (alta hospitalar) podem atuar como reservatórios de cepas de SCoN multiresistentes e consequentemente apresentarem grande potencial de disseminação desses microrganismos na comunidade.

Este estudo revelou diversos problemas e situações inseridas em um local (UTI neonatal) que deveria ser o local mais “seguro” no controle de infecções. A persistência de SCoN MDR neste ambiente é uma condição que será repassada para a direção técnica do hospital. Espera-se que com isso, medidas de prevenção sejam realizadas de forma mais ativa, com uma maior conscientização de todos os profissionais que ali trabalham. É preciso também que o hospital junto, com sua CCIH, continuem este trabalho de vigilância, não somente para estafilococos, e sim para todos os potenciais agentes infecciosos que possam estar presentes no local.

6. Conclusão

A prevalência de neonatos portadores de SCoN durante a internação em uma UTI neonatal no município de Goiânia foi de 67,1%. A incidência de SCoN na coorte dos neonatos durante o período de hospitalização foi de 56,1%.

As espécies mais prevalentes de SCoN foram *S. haemolyticus* (37,6%) e *S. epidermidis* (34,6%).

Nos isolados identificados na admissão foi verificado uma resistência de 58% aos β-lactâmicos, sendo que 60% destes possuem o gene *mec*A. Já dentre aqueles identificados no momento da alta, esta mesma resistência foi de 91,8%, com 82,9% positivos para o gene *mec*A, apresentando também um índice de multiresistência de 42% entre esses isolados durante na alta.

A grande maioria dos isolados de SCoN portadores do gene *mec*A possuíam o SCC*mec* do tipo I (34,3%), que está intimamente relacionado à origem hospitalar.

Identificamos o CPAP como único fator associado à colonização de neonatos por SCoN (p=0,008).

Houve grande variabilidade genética entre os isolados de SCoN identificados na admissão e alta hospitalar, o que sugere uma grande troca de microrganismos dentro do ambiente nosocomial.

7. Referências Bibliográficas

Aires De Sousa, M, Santos Sanches, I, Ferro, ML and De Lencastre, H 2000. Epidemiological study of staphylococcal colonization and cross-infection in two West African Hospitals. *Microb Drug Resist*. 6: 133-141.

ANVISA. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

ANVISA (2008). Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em Neonatologia.

Bannerman, TL, Hancock, GA, Tenover, FC and Miller, JM 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 33: 551-555.

Bauer, AW, Kirby, WM, Sherris, JC and Turck, M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 45: 493-496.

Becker, K, Pagnier, I, Schuhen, B, Wenzelburger, F, Friedrich, AW, Kipp, F, Peters, G and von Eiff, C 2006. Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? *J Clin Microbiol*. 44: 229-231.

Ben Saida, N, Ferjeni, A, Benhadjtaher, N, Monastiri, K and Boukadida, J 2006. Clonality of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates in a neonatal intensive care unit. *Pathol Biol (Paris)*. 54: 337-342.

Ben Saida, N, Marzouk, M, Ferjeni, A and Boukadida, J 2009. A three-year surveillance of nosocomial infections by methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in newborns reveals the disinfectant as a possible reservoir. *Pathol Biol (Paris)*. 57: e29-35.

Berglund, C and Soderquist, B 2008. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 14: 1048-1056.

Blum-Menezes, D, Bratfich, OJ, Padoveze, MC and Moretti, ML 2009. Hospital strain colonization by *Staphylococcus epidermidis*. *Braz J Med Biol Res*. 42: 294-298.

Brugger, SD, Hathaway, LJ and Muhlemann, K 2009. Detection of *Streptococcus pneumoniae* strain cocolonization in the nasopharynx. *J Clin Microbiol*. 47: 1750-1756.

Campeotto, F, Garnier, F, Kalach, N, Soulaines, P, Dupont, C and Raymond, J 2004. A routine prospective survey process to detect nosocomial bacterial colonization in a neonatal unit: risk factors for acquisition. *Arch Pediatr*. 11: 1314-1318.

Cars, O, Molstad, S and Melander, A 2001. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*. 357: 1851-1853.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention.

Chen, L, Mediavilla, JR, Oliveira, DC, Willey, BM, de Lencastre, H and Kreiswirth, BN 2009. Multiplex Real-Time PCR for Rapid Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Typing. *J Clin Microbiol*.

Chlebowicz, MA, Nganou, K, Kozytska, S, Arends, JP, Engelmann, S, Grundmann, H, Ohlsen, K, van Dijl, JM and Buist, G 2009. Recombination between *ccrC* genes in a type V (5C2) Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec* (SCC*mec*) of *Staphylococcus aureus* ST398 leads to MRSA - MSSA conversion *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*.

Chung, M, de Lencastre, H, Matthews, P, Tomasz, A, Adamsson, I, Aires de Sousa, M, Camou, T, Cocuzza, C, Corso, A, Couto, I, Dominguez, A, Gniadkowski, M, Goering, R, Gomes, A, Kikuchi, K, Marchese, A, Mato, R, Melter, O, Oliveira, D, Palacio, R, Sa-Leao, R, Santos Sanches, I, Song, JH, Tassios, PT and Villari, P 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*. 6: 189-198.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.

Correa, JE, De Paulis, A, Predari, S, Sordelli, DO and Jeric, PE 2008. First report of qacG, qacH and qacJ genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 62: 956-960.

Costa, SF, Miceli, MH and Anaissie, EJ 2004. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis*. 4: 278-286.

Couto, I, Pereira, S, Miragaia, M, Sanches, IS and de Lencastre, H 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol*. 39: 3099-3103.

Craft, A and Finer, N 2001. Nosocomial coagulase negative staphylococcal (CoNS) catheter-related sepsis in preterm infants: definition, diagnosis, prophylaxis, and prevention. *J Perinatol*. 21: 186-192.

Cuevas, O, Cercenado, E, Vindel, A, Guinea, J, Sanchez-Conde, M, Sanchez-Somolinos, M and Bouza, E 2004. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 4240-4245.

D'Angio, CT, McGowan, KL, Baumgart, S, St Geme, J and Harris, MC 1989. Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. *J Pediatr*. 114: 1029-1034.

de Mattos, EM, Teixeira, LA, Alves, VM, Rezenda e Resende, CA, da Silva Coimbra, MV, da Silva-Carvalho, MC, Ferreira-Carvalho, BT and Figueiredo, AM 2003. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 45: 13-22.

Deurenberg, RH and Stobberingh, EE 2009. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med*. 9: 100-115.

Dotis, J, Iosifidis, E, Ioannidou, M and Roilides, E 2010. Use of linezolid in pediatrics: a critical review. *Int J Infect Dis*.

Fadeev, SB and Nemtseva, NV 2009. Formation of biofilms by agents of surgical soft tissue infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 114-117.

Ganga, R, Riederer, K, Sharma, M, Fakih, MG, Johnson, LB, Shemes, S and Khatib, R 2009. Role of SCC*mec* type in outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single medical center. *J Clin Microbiol*. 47: 590-595.

Gardiner, D, Dukart, G, Cooper, A and Babinchak, T 2010. Safety and efficacy of intravenous tigecycline in subjects with secondary bacteremia: pooled results from 8 phase III clinical trials. *Clin Infect Dis*. 50: 229-238.

Garza-Gonzalez, E, Morfin-Otero, R, Llaca-Diaz, JM and Rodriguez-Noriega, E 2009. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant

coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol Infect*: 1-10.

Geha, DJ, Uhl, JR, Gustaferro, CA and Persing, DH 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 32: 1768-1772.

Gill, SR, Fouts, DE, Archer, GL, Mongodin, EF, Deboy, RT, Ravel, J, Paulsen, IT, Kolonay, JF, Brinkac, L, Beanan, M, Dodson, RJ, Daugherty, SC, Madupu, R, Angiuoli, SV, Durkin, AS, Haft, DH, Vamathevan, J, Khouri, H, Utterback, T, Lee, C, Dimitrov, G, Jiang, L, Qin, H, Weidman, J, Tran, K, Kang, K, Hance, IR, Nelson, KE and Fraser, CM 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*. 187: 2426-2438.

Grau, S and Rubio-Terres, C 2008. Pharmacoeconomics of linezolid. *Expert Opin Pharmacother*. 9: 987-1000.

Gurtler, V and Stanisich, VA 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142 (Pt 1): 3-16.

Hall-Stoodley, L and Stoodley, P 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 11: 1034-1043.

Hanssen, AM and Ericson Sollid, JU 2006. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 46: 8-20.

Hanssen, AM, Kjeldsen, G and Sollid, JU 2004. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 285-296.

Healy, CM, Palazzi, DL, Edwards, MS, Campbell, JR and Baker, CJ 2004. Features of invasive staphylococcal disease in neonates. *Pediatrics*. 114: 953-961.

Herrmann, DJ, Peppard, WJ, Ledeboer, NA, Theesfeld, ML, Weigelt, JA and Buechel, BJ 2008. Linezolid for the treatment of drug-resistant infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 6: 825-848.

Herschleb, J, Ananiev, G and Schwartz, DC 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc*. 2: 677-684.

Higuchi, W, Takano, T, Teng, LJ and Yamamoto, T 2008. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. *Biochem Biophys Res Commun*. 377: 752-756.

Hira, V, Sluijter, M, Estevao, S, Horst-Kreft, D, Ott, A, de Groot, R, Hermans, PW and Kornelisse, RF 2007. Clinical and molecular epidemiologic characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 26: 607-612.

Hiramatsu, K, Cui, L, Kuroda, M and Ito, T 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 9: 486-493.

Hudome, SM and Fisher, MC 2001. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis*. 14: 303-307.

Huebner, J and Goldmann, DA 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med*. 50: 223-236.

Huebner, J, Pier, GB, Maslow, JN, Muller, E, Shiro, H, Parent, M, Kropec, A, Arbeit, RD and Goldmann, DA 1994. Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J Infect Dis*. 169: 526-531.

Ibrahem, S, Salmenlinna, S, Virolainen, A, Kerttula, AM, Lyytikainen, O, Jagerroos, H, Broas, M and Vuopio-Varkila, J 2009. Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCC*mec* types in a long-term-care facility. *J Clin Microbiol*. 47: 32-37.

Iorio, NL, Ferreira, RB, Schuenck, RP, Malvar, KL, Brilhante, AP, Nunes, AP, Bastos, CC and Dos Santos, KR 2007. Simplified and reliable scheme for species-level identification of Staphylococcus clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 45: 2564-2569.

Ito, T, Okuma, K, Ma, XX, Yuzawa, H and Hiramatsu, K 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*. 6: 41-52.

Jamaluddin, TZ, Kuwahara-Arai, K, Hisata, K, Terasawa, M, Cui, L, Baba, T, Sotozono, C, Kinoshita, S, Ito, T and Hiramatsu, K 2008. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*. 46: 3778-3783.

Jarvis, WR 1996. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 17: 47-52.

Jefferson, KK, Goldmann, DA and Pier, GB 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 2467-2473.

Jensen, MA, Webster, JA and Straus, N 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol*. 59: 945-952.

Kallman, J, Kihlstrom, E, Sjoberg, L and Schollin, J 1997. Increase of staphylococci in neonatal septicaemia: a fourteen-year study. *Acta Paediatr*. 86: 533-538.

Katayama, Y, Ito, T and Hiramatsu, K 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mec*A in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in *mec*A-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 1955-1963.

Kawamura, Y, Hou, XG, Sultana, F, Hirose, K, Miyake, M, Shu, SE and Ezaki, T 1998. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. *J Clin Microbiol*. 36: 2038-2042.

Klingenberg, C, Aarag, E, Ronnestad, A, Sollid, JE, Abrahamsen, TG, Kjeldsen, G and Flaegstad, T 2005. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*. 24: 817-822.

Klingenberg, C, Ronnestad, A, Anderson, AS, Abrahamsen, TG, Zorman, J, Villaruz, A, Flaegstad, T, Otto, M and Sollid, JE 2007. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect*. 13: 1100-1111.

Kloos, WE and Bannerman, TL 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 7: 117-140.

Kloos, WE and Schleifer, KH 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*. 1: 82-88.

Kondo, Y, Ito, T, Ma, XX, Watanabe, S, Kreiswirth, BN, Etienne, J and Hiramatsu, K 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome

mec type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 264-274.

Krediet, TG, Jones, ME, Janssen, K, Gerards, LJ and Fleer, A 2001. Prevalence of molecular types and *mec*A gene carriage of coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol*. 39: 3376-3378.

Lally, RT, Lanz, E and Schrock, CG 2004. Rapid control of an outbreak of *Staphylococcus aureus* on a neonatal intensive care department using standard infection control practices and nasal mupirocin. *Am J Infect Control*. 32: 44-47.

Lankford, MG, Zembower, TR, Trick, WE, Hacek, DM, Noskin, GA and Peterson, LR 2003. Influence of role models and hospital design on hand hygiene of healthcare workers. *Emerg Infect Dis*. 9: 217-223.

Levy, MM, Fink, MP, Fink, MP, Marshall, JC, Abraham, E, Angus, D, Cook, D, Cohen, J, Opal, SM, Vincent, JL and Ramsay, G 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 31: 1250-1256.

Lindsay, JA and Holden, MT 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol*. 12: 378-385.

Livermore , DM 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents*. 16 Suppl 1: S3-10.

Livermore, DM 2000a. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents*. 16 Suppl 1: S3-10.

Livermore, DM 2000b. Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med*. 26 Suppl 1: S14-21.

Longauerova, A 2006. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratisl Lek Listy*. 107: 448-452.

Lopez Sastre, JB and Perez Solis, D 2006. [Definitions of neonatal sepsis: a long way to go]. *An Pediatr (Barc)*. 65: 525-528.

Low, DE, Schmidt, BK, Kirpalani, HM, Moodie, R, Kreiswirth, B, Matlow, A and Ford-Jones, EL 1992. An endemic strain of *Staphylococcus haemolyticus* colonizing and causing bacteremia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatrics*. 89: 696-700.

Merino-Diaz, L, Cantos de la Casa, A, Torres-Sanchez, MJ and Aznar-Martin, J 2007. Detection of inducible resistance to clindamycin in cutaneous isolates of

Staphylococcus spp. by phenotypic and genotypic methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 25: 77-81.

Milheiriço, C, Oliveira, DC and de Lencastre, H 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 3374-3377.

Milkovich, G 2009. Future pharmacoeconomic criteria for the treatment of infections. *Int J Antimicrob Agents*. 34 Suppl 1: S12-14.

Miragaia, M, Couto, I, Pereira, SF, Kristinsson, KG, Westh, H, Jarlov, JO, Carrico, J, Almeida, J, Santos-Sanches, I and de Lencastre, H 2002. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol*. 40: 430-438.

Miragaia, M, Thomas, JC, Couto, I, Enright, MC and de Lencastre, H 2007. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*. 189: 2540-2552.

Molina-Cabrillana, J, Santana-Reyes, C, Hernandez, J, Lopez, I and Dorta, E 2006. Incidence of nosocomial infections at a neonatal intensive care unit: a six-year surveillance study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 24: 307-312.

Mombach Pinheiro Machado, AB, Reiter, KC, Paiva, RM and Barth, AL 2007. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microbiol*. 56: 1328-1333.

Mongkolrattanothai, K, Boyle, S, Kahana, MD and Daum, RS 2003. Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis*. 37: 1050-1058.

Mulvey, MR, Chui, L, Ismail, J, Louie, L, Murphy, CC, N. and Alfa, M 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 39: 3481-3485.

Murray, PR, Rosenthal, KS and Pfaller, MA (2005). Microbiologia Médica. . . Pages.

Natoli, S, Fontana, C, Favaro, M, Bergamini, A, Testore, GP, Minelli, S, Bossa, MC, Casapulla, M, Broglio, G, Beltrame, A, Cudillo, L, Cerretti, R and Leonardis, F 2009. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood

with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect Dis*. 9: 83.

Oliveira, DC and de Lencastre, H 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 2155-2161.

Patrick, CH, John, JF, Levkoff, AH and Atkins, LM 1992. Relatedness of strains of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* colonizing hospital personnel and producing bacteremias in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 11: 935-940.

Pessoa-Silva, CL, Richtmann, R, Calil, R, Santos, RM, Costa, ML, Frota, AC and Wey, SB 2004. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 25: 772-777.

Pfaller, MA, Acar, J, Jones, RN, Verhoef, J, Turnidge, J and Sader, HS 2001. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis*. 32 Suppl 2: S156-167.

Piette, A and Verschraegen, G 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*. 134: 45-54.

Research-Japan, G-i-AfsCC. Staphylococcus.net.

Rogers, KL, Fey, PD and Rupp, ME 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 23: 73-98.

Ronnestad, A, Abrahamsen, TG, Medbo, S, Reigstad, H, Lossius, K, Kaaresen, PI, Engelund, IE, Irgens, LM and Markestad, T 2005. Septicemia in the first week of life in a Norwegian national cohort of extremely premature infants. *Pediatrics*. 115: e262-268.

Rossolini, GM and Mantengoli, E 2008. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect*. 14 Suppl 6: 2-8.

Ruppe, E, Barbier, F, Mesli, Y, Maiga, A, Cojocaru, R, Benkhalfat, M, Benchouk, S, Hassaine, H, Maiga, I, Diallo, A, Koumare, AK, Ouattara, K, Soumare, S, Dufourcq, JB, Nareth, C, Sarthou, JL, Andremont, A and Ruimy, R 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 442-449.

Saiman, L 2006. Strategies for prevention of nosocomial sepsis in the neonatal intensive care unit. *Curr Opin Pediatr*. 18: 101-106.

Saruta, K, Matsunaga, T, Kono, M, Hoshina, S, Ikawa, S, Sakai, O and Machida, K 1997. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett*. 146: 271-278.

Sasaki, T, Tsubakishita, S, Tanaka, Y, Sakusabe, A, Ohtsuka, M, Hirotaki, S, Kawakami, T, Fukata, T and Hiramatsu, K 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*.

Seybold, U, Reichardt, C, Halvosa, JS and Blumberg, HM 2009. Clonal diversity in episodes with multiple coagulase-negative *Staphylococcus* bloodstream isolates suggesting frequent contamination. *Infection*. 37: 256-260.

Srivastava, S and Shetty, N 2007. Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. *J Hosp Infect*. 65: 292-306.

Tabe, Y, Nakamura, A and Igari, J 2001. Glycopeptide susceptibility profiles of nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *J Infect Chemother*. 7: 142-147.

Tenover, FC, Arbeit, RD and Goering, RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 18: 426-439.

Tenover, FC, Gay, EA, Frye, S, Eells, SJ, Healy, M and McGowan, JE, Jr. 2009. Comparison of Typing Results for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates by the DiversiLab System and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol*.

van Soolingen, D, de Haas, PE, Hermans, PW and van Embden, JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol*. 235: 196-205.

Venkatesh, MP, Placencia, F and Weisman, LE 2006. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Semin Pediatr Infect Dis*. 17: 120-127.

Vuong, C, Voyich, JM, Fischer, ER, Braughton, KR, Whitney, AR, DeLeo, FR and Otto, M 2004. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*. 6: 269-275.

Walz, JM, Memtsoudis, SG and Heard, SO 2010. Prevention of Central Venous Catheter Bloodstream Infections. *J Intensive Care Med*.

Yalaz, M, Cetin, H, Akisu, M, Aydemir, S, Tunger, A and Kultursay, N 2006. Neonatal nosocomial sepsis in a level-III NICU: evaluation of the causative agents and antimicrobial susceptibilities. *Turk J Pediatr*. 48: 13-18.

Yoshida, K, Shoji, H, Hanaki, H, Yanagisawa, C, Ikeda-Dantsuji, Y, Fukuchi, K, Adachi, M and Niki, Y 2009. Linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated after long-term, repeated use of linezolid. *J Infect Chemother*. 15: 417-419.

Zhang, L and Mah, TF 2008. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol*. 190: 4447-4452.

Zhang, Y, Agidi, S and Lejeune, JT 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J Appl Microbiol*.

Anexo 1

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 008/07 **Goiânia, 29/05/2007**

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): *Dra. Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade*

TÍTULO: *"Epidemiologia molecular se Staphylococcus Aureus de portador nasal e de infecções invasivas em crianças atendidas no pronto atendimento de UTIs de Goiânia"*

Área Temática: *Grupo III*
Local de Realização: *IPTSP/UFG*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **aprovou sem restrições,** o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

➔Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

➔O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 3269 8338 - FAX: 3269 8426
GOIÂNIA - GOIÁS

Anexo 2

SUS
Sistema Único de Saúde

SES
SECRETARIA
DA SAÚDE

Hospital Materno Infantil

GOIÁS
Um Estado melhor a cada dia

CARTA DE APROVAÇÃO

Goiânia, 06 de março de 2007.

Protocolo CEP-HMI Nº 006/07
Titulo do Projeto: Epidemiologia Molecular de Staphylococcus Aureus de portador nasal e de Infecções invasivas em crianças atendidas no pronto atendimento de UTIS de Goiânia.
Sr.(a):Investigador(a) Responsável: Ana Lucia Sgambatti de Andrade.

Comunicamos-lhe que no dia 02 de março de 2007 na reunião mensal do **Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Materno Infantil CEP-HMI**, analisou e aprovou o Projeto de Pesquisa acima referido bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e estes considerados conforme com os princípios éticos vigentes

Lembramos, ainda, ao investigador responsável, a necessidade de encaminhar ao CEP-HMI relatórios trimestrais do andamento, encerramento, conclusão e publicação da pesquisa.

Atenciosamente,

Dr. Marco Aurélio Albernaz
Coordenador do CEP-HMI

Dr. Marco Aurélio Albernaz
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - HMI

Missão:
Promover a saúde da mulher e da criança por meio das ações sócio-educativas e assistência médico-hospitalar, no contexto da saúde pública do Estado de Goiás e contribuir para o desenvolvimento científico através do ensino e pesquisa.

Visão:
Ser referência em serviços especializados nas áreas da saúde da mulher e da criança, com enfoque na humanização da assistência integral aos seus clientes.

Anexo 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

Título do Estudo: Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* de portador nasal e de infecções invasivas em crianças atendidas no Pronto Atendimento e UTIs de Goiânia

Investigadora Principal: Ana Lúcia S. S. Andrade, M.D., Ph.D.
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Universidade Federal de Goiás.
Tel. (62) 3202-7942

Iniciais do(a) Paciente	Número do(a) Paciente	Data de Nascimento
_____	_____	_____

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado(a) para que seu filho participe de uma pesquisa. O objetivo desta pesquisa é obter informações sobre uma bactéria chamada *Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* é uma bactéria oportunista, que pode colonizar indivíduos de todas as faixas etárias, especialmente crianças com idade inferior a cinco anos. Quando presente em um hospedeiro, o *S. aureus* pode produzir manifestações clínicas ou pode permanecer completamente assintomático, condição esta conhecida como portador são e, a única forma de reconhecê-lo, é por meio de métodos laboratoriais.

O portador nasal tem sido documentado como fator de risco para infecção sistêmica por *S. aureus* e as crianças portadoras desempenham papel central na epidemiologia e patogênese da infecção. Portanto, a relevância do *S. aureus* em saúde pública deve-se às suas altas taxas de morbidade e mortalidade na infância, tanto em países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento.

Este estudo obterá informações sobre a prevalência de portador nasal de *Staphylococcus aureus* comunitários, resistentes à meticilina (MRSA), em crianças atendidas no pronto atendimento de hospitais do município de Goiânia e também sobre a prevalência de infecções invasivas por MRSA comunitários e nosocomiais no momento da admissão da criança nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) pediátricas. A resistência aos antibióticos também será avaliada para ajudar na orientação das políticas nacionais de saúde.

O estudo está sendo conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Goiás, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. A participação do seu filho é voluntária, o que significa que ele/ela participará do estudo somente se você quiser. Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e contém informações sobre o estudo, incluindo os procedimentos do estudo, e possíveis benefícios e riscos. Você também vai conversar com um membro do grupo sobre o estudo antes de decidir se o seu filho deverá participar. É importante

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Hospital Materno Infantil

que você obtenha todas as informações necessárias sobre este estudo para decidir se você quer que seu filho participe. Um membro do grupo falará com você sobre este estudo e responderá suas perguntas. Você também pode conversar com sua família e amigos para decidir sobre a participação de seu filho. Você pode dispor do tempo necessário para tomar sua decisão.

A sua assinatura ao final deste formulário significa que você leu e entendeu as informações e que você voluntariamente concorda que seu filho deva participar deste estudo. A Dra. Ana Lúcia Andrade e seu grupo obterão sua assinatura neste formulário após explicar o estudo e seus procedimentos, responder a todas as suas perguntas e esclarecer todas as suas dúvidas. Você receberá uma cópia assinada e datada deste formulário de consentimento.

Aproximadamente 2.000 crianças participarão deste estudo. A participação do seu filho será por 1 (um) dia.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é determinar quantas crianças com idade menor de cinco anos atendidas em serviços de pronto atendimento (PA) e respectivas UTIs pediátricas de Goiânia, são portadoras do *Staphylococcus aureus* e/ou apresentam esta bactéria no sangue.

Seu filho está sendo solicitado a participar deste estudo pois este é um estudo de vigilância epidemiológica no qual todas as crianças menores de cinco anos que forem atendidas no Pronto Atendimento e UTIs onde o estudo está sendo realizado, serão convidadas a participar.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Qualquer procedimento para este estudo deve ser realizado após você concordar que seu filho participe. Sua decisão para a participação de seu filho estará documentada pela sua assinatura e data neste formulário.

É importante para a segurança de seu filho que você responda honesta e completamente a todas as perguntas. Qualquer alteração que ocorrer antes ou durante o estudo você deve comunicar ao investigador do estudo. Se for determinado que seu filho é elegível, ele/ela pode continuar a participar do estudo, o qual necessita das seguintes etapas:

Se seu filho for atendido em um Pronto Atendimento ou admitido em uma UTI Pediátrica participante do estudo, será realizado uma entrevista, na qual um investigador fará perguntas sobre a saúde de seu filho e a situação de vida.

Para as crianças atendidas no Pronto Atendimento e também para as crianças admitidas nas UTIs Pediátrica, será coletada uma amostra de secreção nasal da narina anterior por meio de *swab* ultrafino, com haste flexível.

Para as crianças admitidas nas UTIs será ainda coletada uma amostra de sangue, de aproximadamente 5ml para pesquisar a presença da bactéria no sangue. O sangue é normalmente colhido do braço da criança com uma pequena agulha e pode causar algum desconforto. Este procedimento pode levar de 5 a 10 minutos. Este procedimento de coleta de sangue para cultura e antibiograma faz parte da rotina do serviço. Se a bactéria for encontrada no sangue após ser enviado ao laboratório, outros testes serão realizados no laboratório para identificar o tipo da bactéria e tipos de antibióticos que podem combatê-la.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Hospital Materno Infantil

Os resultados da hemocultura de seu filho ficarão prontos em 2 a 7 dias. Não haverá outros procedimentos a serem realizados além daqueles da rotina do hospital. Todos os resultados de exames de laboratório de seu filho serão encaminhados ao médico dele/dela.

Se a cultura de sangue de seu filho apresentar uma bactéria chamada meningococo, a mesma será armazenada de acordo com os procedimentos padrão do laboratório para tipagem e realização de testes de sensibilidade aos antibióticos.

RISCOS

Os riscos da participação neste estudo incluem inchaço ou hematoma ao redor da veia onde seu sangue foi coletado. Há um pequeno risco de infecção no local onde o sangue foi coletado. No entanto, este procedimento de coleta de sangue faz parte da rotina do serviço.

BENEFÍCIOS ASSOCIADOS AO ESTUDO

Não há benefício esperado para o seu filho pela participação neste estudo. Entretanto, a participação de seu filho pode ajudar o médico a tratar seu filho.

ALTERNATIVAS À PARTICIPAÇÃO

Pelo fato do estudo não apresentar benefício esperado, a alternativa para ele/ela é não participar.

CONFIDENCIALIDADE

Os registros médicos de seu filho terão garantia de sigilo e confidencialidade. Somente o investigador e a equipe de pesquisa terão acesso aos registros de seu filho. As diretrizes do Conselho Federal de Medicina serão seguidas em caso de auditorias de atos médicos.

PAGAMENTO OU REEMBOLSO

Você não receberá pagamento pela participação do seu filho.

CUSTOS

A coleta de sangue para cultura e *swabs* nasal será realizada sem custos para você. Você não terá qualquer custo adicional para a participação de seu filho neste estudo.

CONTATOS

Se você tiver perguntas sobre os direitos de seu filho como sujeito de pesquisa, por favor ligue para o Comitê de Ética do Hospital Materno Infantil – Dr. Marco Aurélio Albernaz no telefone 3291-4900 ramal 238.

Se você tiver perguntas sobre este estudo ou se você acha que seu filho sofreu alguma lesão relacionada aos procedimentos deste estudo e você gostaria de informação sobre tratamento, por favor ligue para Dra. Ana Lucia Andrade no telefone 3202-7998.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação do seu filho é voluntária. Seu filho não precisa participar. Você pode interromper a participação dele a qualquer momento. Se você não deseja que seu filho participe do estudo ou se você decidir que gostaria que seu filho fosse retirado do estudo, não há nenhuma penalidade.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Hospital Materno Infantil

Se seu filho não participar ou se você interromper a participação dele/dela no estudo, seu filho não perderá nenhum benefício a que tem direito. Se você decidir retirar seu filho do estudo, você pode solicitar que o material biológico de seu filho seja destruído. Se seu filho interromper precocemente a participação no estudo ele/ela não precisará realizar qualquer procedimento adicional. Se, por qualquer circunstância, o estudo for cancelado, você pode contactar a Investigadora Principal ou outra pessoa do grupo do estudo para informações sobre o cancelamento do estudo.

CONSETIMENTO PARA PAIS ALFABETIZADOS DO PACIENTE

Eu li e entendi as informações apresentadas e minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Eu voluntariamente concordo que meu filho participe neste estudo. Eu não renuncio aos meus direitos legais assinando este formulário de consentimento. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste formulário de consentimento e outra cópia será armazenada nos arquivos do estudo do investigador.

Pai/Mãe do Paciente:

Nome por Extenso do Pai/Mãe do Paciente	Assinatura Pai/Mãe do Paciente	Data da Assinatura

Representante Legal Alfabetizado (se aplicável):

Nom por Extenso do Representante Legal	Assinatura Representante Legal	Data da Assinatura

CONSETIMENTO PARA PAIS NÃO ALFABETIZADOS DO PACIENTE

As informações acima foram lidas para mim por _____, RG_____. Eu entendi as explicações e minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Eu voluntariamente concordo que meu filho participe neste estudo. Eu não renuncio aos meus direitos legais assinando este formulário de consentimento. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste formulário de consentimento e outra cópia será armazenada nos arquivos do estudo do investigador.

Pai/Mãe do Paciente:

Nome por Extenso do Pai/Mãe do Paciente	Impressão do Polegar Direito Pai/Mãe do Paciente	Data da Impressão

Representante Legal Não Alfabetizado (se aplicável):

Nome por Extenso Representante Legal do Paciente	Impressão do Polegar Direito Representante Legal do Paciente	Data da Impressão

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Hospital Materno Infantil

Testemunha Imparcial* (se aplicável):

Nome por Extenso Testemunha Imparcial	Assinatura Testemunha Imparcial	Data da Assinatura

* Testemunha imparcial não é necessária a menos que o pai/mãe do paciente seja incapaz de ler (ex., cego ou analfabeto) ou a menos que indicado no protocolo. Se a testemunha estiver presente, ela deve observar o processo completo da obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido.

Investigador que obteve o consentimento:

Nome por Extenso do Investigador	Assinatura do Investigador	Data da Assinatura

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo