



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

HELISANGELA DE ALMEIDA SILVA

**Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares de
infecções por *Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina
(MSSA) em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de
um Hospital Universitário Brasileiro.**

UBERLÂNDIA-MG
OUTUBRO-2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

***Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares de infecções por
Staphylococcus aureus suscetível a meticilina (MSSA) em uma Unidade
de Terapia Intensiva Neonatal de um Hospital Universitário Brasileiro.***

HELISANGELA DE ALMEIDA SILVA

PAULO P. GONTIJO FILHO (ORIENTADOR)

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Imunologia e parasitologia)

UBERLÂNDIA-MG
OUTUBRO-2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares de infecções por
Staphylococcus aureus suscetível a meticilina (MSSA) em uma Unidade
de Terapia Intensiva Neonatal de um Hospital Universitário Brasileiro.

HELISANGELA DE ALMEIDA SILVA

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Imunologia e parasitologia)

UBERLÂNDIA-MG
OUTUBRO-2007

HELISANGELA DE ALMEIDA SILVA

**Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares de infecções por
Staphylococcus aureus suscetível a meticilina (MSSA) em uma Unidade
de Terapia Intensiva Neonatal de um Hospital Universitário Brasileiro.**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Imunologia e parasitologia)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Branca Maria de O. Santos

Profa. Dra. Adriana G. Oliveira

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas

Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho

UBERLÂNDIA-MG

OUTUBRO-2007

S586a Silva, Helisangela de Almeida, 1975-

**Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares de
infecções por *Staphylococcus aureus* suscetível a
meticilina (MSSA) em uma Unidade de Terapia
Intensiva Neonatal de um Hospital Universitário
Brasileiro /**

Helisangela de Almeida Silva. - 2007.

64 f. : il.

Orientadora: Paulo P. Gontijo Filho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Infecção hospitalar - Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Uni-versidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III.
Título.

CDU: 616.98 : 615.478

Trabalho realizado no laboratório de microbiologia da Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho, com auxílio financeiro da CAPES.

*"Podemos escolher o que semear,
mas somos obrigados a colher aquilo
que plantamos" (provérbio
chinês)*

À Deus,

*Devemos tudo àquele que nos deu sabedoria para descobrirmos nossa
vocação, força para superarmos os tantos obstáculos tornando um sonho
realidade.*

Aos meus pais

A vocês que me deram vida e me ensinaram a viver com dignidade.

*A vocês que iluminaram os meus caminhos obscuros com afeto e
dedicação... Tenho certeza que meus triunfos também são seus.*

Ao meu esposo, Jair

A você que muito me ajudou com seu amor, carinho e dedicação.

Um obrigado seria pouco...

À Maria Clara,

*A pequenina que se tornou minha razão de viver e minha inspiração para
todos os momentos difíceis que atravesso.*

Ao Gabriel,

*A você que ainda não chegou oficialmente, mas já ocupa um grande
espaço em nossos corações.*

Agradecimentos

Ao Dr Paulo, pela paciência, sabedoria e valiosa orientação para que este trabalho se realizasse da melhor maneira possível,

Aos membros da banca: Dr. Geraldo Sadoyama, Dra. Rosineide Marques Ribas, Dra. Branca M. O. Santos, Dra. Adriana G. de Oliveira, pela contribuição e participação na mesma,

As minhas grandes amigas, Lizandra, Renata e Cristina, cada qual participando de uma etapa da minha vida,

A Denise, minha companheira de coletas na UTIN,

Aos colegas do laboratório: Dayane, Lílian, Karine, Juliane, Elias, Rodolfo, Michel e todos os demais pela convivência harmoniosa,

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia, Claudete, Ricardo e Samuel,

Aos profissionais do laboratório de microbiologia do HC-UFU,

Aos amigos João Martins Neto e Lucileide pela insuperável colaboração, paciência e amizade de todos os dias,

A profa. Dra. Kátia Regina pela orientação na realização das técnicas moleculares e a toda a equipe de seu laboratório pela convivência prazerosa durante a minha estadia na UFRJ,

Aos profissionais do berçário da UFU, em especial à Dra. Vânia Abdallah e a enfermeira Dora,

Às crianças da UTIN incluídas no meu estudo, extensivo aos seus familiares em respeito a sua dor, sem as quais este trabalho não poderia ser efetivado,

A todos os demais que porventura não foram listados, mas que fazem parte deste cotidiano, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Objetivos	11
3. Casuística e métodos	12
Hospital	12
Modelo do estudo	12
Vigilância	13
Definição de Infecção Hospitalar	13
Colonização	13
Técnicas microbiológicas	14
Coleta das amostras e espécimes clínicos	14
Cultivo Primário	14
Estocagem das amostras	14
Identificação das amostras isoladas	14
Produção da enzima catalase	15
Atividade de DNA-se	15
Presença de coagulase	15
Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	15
Método de difusão em Agar	15
Agar de triagem com oxacilina	16
Tipagem molecular	16
PCR	16
Obtenção do DNA bacteriano através de lise térmica	16
Reação de PCR Multiplex-Identificação de <i>S. aureus</i> e <i>MecA</i>	17
PCR – Identificação de Leucocidina de Panton Valentine	18

Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	18
Extração do DNA genômico	18
Digestão com Endonuclease de Restrição	19
Eletroforese em Campo Pulsante	19
Análise estatística	20
Aprovação do Comitê de ética	20
4- RESULTADOS	21
5- DISCUSSÃO	36
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7- ANEXOS	57

Lista de tabelas

Página

Tabela 1: Colonização de neonatos por <i>Staphylococcus aureus</i> em 18 inquéritos de prevalência realizados na UTIN do HC-UFU de Janeiro/2004 a junho/2005	22
Tabela 2: Colonização por MRSA e MSSA em diferentes sítios anatômicos em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/04 a junho/2005	22
Tabela 3: Incidência de infecções estafilocócicas na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/2004 –junho/2005	23
Tabela 4: Infecções hospitalares por <i>S. aureus</i> em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/04 a junho/05	24
Tabela 5: Infecções estafilocócicas segundo localização anatômica em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/04 a junho/05	26
Tabela 6: Estudo caso (colonização/infecção por <i>S.aureus</i>) versus controle em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/2004 a junho/2005	27
Tabela 7: Suscetibilidade das amostras de <i>S.aureus</i> pela técnica de difusão em gel	28
Tabela 8: Colonização e infecção por MSSA em 29 neonatos na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/2004 a junho/2005	33

Lista de figuras

	Página
Figura 1: Distribuição dos casos de Infecção Hospitalar por <i>Staphylococcus aureus</i> na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/04 a junho/05	25
Figura 2: PCR Multiplex: Detecção de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> portadoras do gene <i>mecA</i>	30
Figura 3: PCR: Detecção dos genes <i>pvl</i> em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> .	30
Figura 4: Distribuição dos neonatos colonizados e infectados por MSSA, na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/2004 a junho/2005.	32
Figura 5: Distribuição dos neonatos colonizados e infectados por MSSA pelo clone B, na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/2004 a junho/2005.	33
Figura 6 A e B: Modelo representativo de PFGE de 19 isolados de MSSA da UTIN do HC-UFU.	35

Lista de anexos

Anexo 1: Ficha de vigilância de Infecções Hospitalares.	58
Anexo 2: Ficha de colonização por <i>Staphylococcus aureus</i> .	59
Anexo 3: Parecer do comitê de ética em pesquisa.	60
Anexo 4: Artigo publicado no Journal of Hospital Infection.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection

BAR: Berçário de Alto Risco

BHI: “Brain Heart Infusion

CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”

CI: “Confidence Intervals”

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CVC: Cateter Vascular Central

CVP: Cateter Vascular periférico

ECN: Estafilococos coagulase negativo

HC-UFU: Hospital de Clinicas da Universidade Federal de Uberlândia

IHs: Infecções Hospitalares

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina

NNISS: “National Nosocomial Infections Surveillance System”

OR: “Odds Ratio”

ORECN: Estafilococos coagulase-negativos resistentes a oxacilina

PBP: Proteína ligante de penicilina

PCR: “Polymerase Chain Reaction”

PFGE: Eletroforese em campo pulsátil

PICC: Cateter Central de Inserção Periférica

rpm: Rotação por minuto

SCIH: Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

SMH: Síndrome da Membrana Hialina

TSA: “Trypticase Soy Agar”

TSB: “Trypticase Soy Broth”

TBE: Tris, Ácido Bórico, EDTA

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

UTIN Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

UV: Ultra Violeta

VM: Ventilação Mecânica

RESUMO

A Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) é uma das unidades onde o problema das infecções hospitalares (IHs) é mais significativo, em função da alta frequência de fatores de risco intrínsecos e extrínsecos. Foram realizados dois estudos, o primeiro retrospectivo (janeiro/2001 a dezembro/2003), com o objetivo de comparar as taxas de infecções hospitalares, antes, durante e após uma reforma na unidade; e o segundo prospectivo (janeiro/2004 a junho/2005), analisando a incidência de infecção e prevalência de colonização, respectivamente, por *Staphylococcus aureus*. O primeiro estudo evidenciou um aumento significativo de 12,8 para 18,6 na taxa de infecção hospitalar, após a mudança para a localização temporária; e um declínio ainda mais expressivo ($p < 0,001$) na de bacteremia relacionada ao cateter após a mudança para a unidade nova, apesar do aumento na densidade de utilização de cateter vascular central (CVC) de 0,18 para 0,55 nos dois períodos. Essa diferença ocorreu simultaneamente à substituição da técnica de inserção do CVC pela dissecação de veia (flebotomia) pelo emprego do cateter de inserção periférica (PICC). Na segunda fase da investigação, os casos de infecções estafilocócicas foram detectados pelas técnicas de vigilância NNISS e laboratorial. A taxa de incidência de infecção hospitalar detectada foi de 23/1000 pacientes/dia; dos 32 neonatos avaliados, dezessete estavam infectados e quinze colonizados. A síndrome infecciosa mais frequente foi sepse (61%), sendo a narina o sítio mais colonizado (66 %). O uso de antibióticos foi a única variável significante para infecção por *S. aureus*. Os fatores de risco por análise univariada para infecção/colonização por este microrganismo foram: o uso de antibióticos, utilização de cateter vascular central (CVC), uso do CVC por mais que sete dias e sua inserção por flebotomia, sendo a última variável a única significativa pela análise multivariada. A análise molecular das 37 amostras demonstrou uma policlonalidade (doze genótipos), com o predomínio do clone B (34%), e identidade clonal foi observada em todos os casos em que foi possível determinar a relação entre amostras de colonização e de infecção; o gene *pvl* foi detectado em quatro amostras de colonização. A infecção por MSSA foi associada com colonização prévia pelo patógeno, com evidência de transmissão horizontal entre os neonatos em função da predominância do clone B, e da ocorrência de “micro-clusters” na unidade.

Palavras-chave: UTIN, Infecção Hospitalar, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Neonatal Intensive Care Unit is the unit in which hospital infectious problems (HI) are the most significant ones, due to high frequency of intrinsic e extrinsic risk factors. Two investigations were performed. The first of them was a retrospective study from January, 2001 to December, 2003, whose aim was to compare hospital infection rates before, during and after a unit reform; the second one was a prospective search that analyzed infection incidence and colonization respective prevalence for *Staphylococcus aureus*. The first study showed a significant 12.8 to 18.6 increase on hospital infection rate, after the removal to a temporary location as well a more expressive decline ($p < 0,001$) in catheter-related bacteremia after the removal to new unit, in spite of an increased central vascular catheter utilization density (CVC) from 0.18 to 0.55 in both periods. This difference has simultaneously occurred with the substitution of vein dissection CVC insertion technique (phlebotomy) by the employment of a peripheral insertion catheter (PICC). In the second phase of the investigation, staphylococcus infections were detected by laboratorial and NNISS vigilance techniques. The detected incidence rates for hospital infection was 23/1000 patient/day. From 32 evaluated newborn, 17 were infected and 15 colonized. Sepsis was the most frequent infectious syndrome (61%) and the nose was the most colonized site (66%). Antibiotic use showed to be the only significant variable for *S. aureus* infection. Risk factors by univariate analysis were the following ones: antibiotics use, central vascular catheter (CVC) utilization, CVC use for more than seven days and phlebotomy insertion. This was the only significant variable by multivariate analysis. Molecular analysis of 37 samples showed a policlonality (12 genotypes), and B clone prevailed (34%) over the other ones. Clone identity was observed in all cases in which it was possible to determinate the relationship between colonizing and infecting samples. The *pvl* gene was detected in four colonizing samples. MSSA infection was associated to previous colonizing by pathogen, with evidence of horizontal transmission among newborn, in function of B clone prevailing as well micro-clusters occurrence in the unit.

Key words: NICU, Nosocomial infection - *Staphylococcus aureus*.

1- INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares (IHs) são uma das principais causas do aumento nas taxas de morbidade, mortalidade e custos relacionados à hospitalização (WENZEL, 2004). Constituem um sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, onde os recursos humanos e financeiros são muito limitados (NETLEMAN, 1993) e uma minoria dos hospitais possuem comissões de controle de infecções ativas (PRADE, 1995). A vigilância epidemiológica dessas infecções é necessária para o melhor controle e exige profissionais de saúde treinados e uma sistemática de trabalho acessível e aplicável (PONCE DE LEON, 1991).

Os pacientes neonatos, particularmente os prematuros, são muito suscetíveis às IHs, em decorrência da imaturidade do sistema imunológico, anomalias congênitas, hospitalização prolongada e utilização de dispositivos invasivos (SIEGEL, 1998). Estudos realizados nos últimos quinze anos detectaram que as taxas de IHs em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) são elevadas, variando de 8 a 40%, e que é possível prevenir 30% delas por vigilância, diminuição no uso de antibióticos, limitação no uso de procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos (AURITI, *et al.*, 2003). O “*National Nosocomial Infections Surveillance System*” (NNISS) do “*Centers for Disease Control and Prevention*” (CDC) relata uma alta taxa de bacteremias hospitalares em UTINs, especialmente em neonatos de baixo peso, comparada com a de outras unidades de Terapia Intensiva, com exceção da unidade de

queimados (ZAIDI *et al.*, 2005).

No Brasil, calcula-se que os pacientes mantidos em UTINs/ Berçário de alto risco têm as taxas mais altas, que variam de 6 a 30 infecções por 100 altas. Entre as unidades hospitalares, o berçário é uma das unidades em que ocorrem mais infecções e surtos (STARLING, PINHEIRO, COUTO, 1993). Brito e colaboradores (2003), na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/2000 a agosto/2002, relataram 113 episódios de infecção hospitalar, envolvendo 99 neonatos, correspondendo a uma taxa de infecção hospitalar de 18%.

As infecções neonatais são divididas em dois grupos: precoces, que se apresentam nas primeiras 72 horas de vida, relacionadas a fatores de risco maternos e aquisição no canal do parto, e tardias, após 72 horas de vida, sendo a aquisição possível em casa ou no ambiente hospitalar (ZAIDI *et al.*, 2005).

A pele e as mucosas do feto não apresentam microbiota, mas tornam-se contaminadas a partir das mãos de profissionais de saúde logo após o nascimento. Os microrganismos que normalmente colonizam os neonatos são potencialmente invasivos e em hospedeiro cuja pele, mucosas e imunidade estão ainda em desenvolvimento representam risco de infecção (WAGGONER-FOUNTAIN, DONOWITZ, 1995).

Os fatores de risco que predisõem infecções hospitalares em UTINs podem ser divididos em: intrínsecos, ou seja, inerentes ao próprio paciente, como idade, sistema imunológico imaturo, proteção diminuída no que se refere a barreiras naturais como a pele, ausência de microbiota endógena, baixo peso, prematuridade e gravidade da doença de base; e extrínsecos, que incluem as intervenções cirúrgicas, presença de dispositivos invasivos, tais como cateteres intravasculares periféricos e centrais, tubos endotraqueais, sondas nasogástricas e drenos (SIEGEL, 1998; SINGH-NAZ, 1996).

Os sítios de infecção nosocomial em recém-nascidos diferem daqueles presentes em adultos. Infecções sanguíneas primárias são responsáveis por 30 a 50% dos episódios em neonatos, ao passo que infecções trato urinário e de sítio cirúrgico são raras (SARKAR *et al.*, 2006), embora representem cerca de 40% e 20% das infecções em adultos, respectivamente (GOLDMANN, SANDS, 1998).

A transmissão por contato direto por intermédio das mãos está relacionada com quase todas essas infecções, pela sua facilidade de contaminação e disseminação de patógenos, sendo responsável por, aproximadamente, 20 a 40% das infecções hospitalares resultantes de transmissão cruzada por profissionais de saúde (WEINSTEIN, 2001).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 40 espécies e 24 subespécies amplamente distribuídas na natureza (EUZEBY, 2007), e o *S. aureus* é a espécie de maior participação em infecções humanas, sendo considerada também a mais patogênica. Este microrganismo está entre os principais agentes de infecções adquiridas nos hospitais, que resultam em grande morbidade e mortalidade (BANNERMAN, 2003).

Os estafilococos crescem bem em condições anaeróbicas ou microaerófilas e mais rapidamente a 37⁰C; são relativamente resistentes ao dessecamento, ao calor e ao cloreto de sódio a 9%. O *Staphylococcus aureus* é considerado um microrganismo comensal nas narinas anteriores, pele úmida, e mucosas de boca e intestino, através de colonização rápida e potencialidade de invasão posterior através de pequenas lesões (MURRAY, 1998; AYLIFFE *et al.*, 1998). As infecções por *S. aureus*, geralmente são precedidas por colonização previa, principalmente nasal, que ocorre em cerca de 30% dos indivíduos sadios ou hospitalizados (VAN DEN BERGH *et al.*, 1999; SCANVIC *et al.*, 2001).

O *Staphylococcus aureus* pode causar doença devido à sua capacidade de multiplicar-se e disseminar-se amplamente nos tecidos e órgãos, por meio da produção de substâncias extracelulares (enzimas e toxinas). A supuração focal resultando em abscessos é típica de infecção estafilocócica. A partir de qualquer foco, os microrganismos podem propagar-se através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para outras partes do corpo, causando pneumonia, meningite, empiema, endocardite, osteomielite, septicemia entre outras infecções (GONÇALVES 1985; BRATU *et al.*, 2005).

Nos EUA, *Staphylococcus aureus* é um dos três agentes mais frequentes de infecções hospitalares, respondendo, sobretudo pela etiologia das infecções de sítio cirúrgico, pneumonias e bacteremias primárias (GOLDMAN, PLATT, HOPKINS, 1992). Em hospitais onde este microrganismo se torna endêmico, ele contribui com 10 a 15 % das infecções adquiridas no hospital (BOYCE, WHITE, SPRUILL, 1983). No Brasil, a sua frequência é alta, sendo responsável por 20% das infecções de corrente sanguínea no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo (TRINDADE, *et al.*, 2005).

O *S. aureus* dominante no ambiente hospitalar na década de 50, caracterizou-se pela resistência à penicilina através da produção de penicilinase. A introdução de outros antibióticos como estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos, também foi acompanhada pelo aparecimento de microrganismos resistentes a estes antibióticos (LYON, SKURRAY, 1987, REGEV-YOCHAV, *et al.*, 2005).

A primeira penicilina semi-sintética resistente à penicilinase, a meticilina/oxacilina (MRSA/ORSA), foi introduzida no tratamento de *S. aureus* em 1959, porém dois anos depois, foram isoladas as primeiras amostras resistentes a este antimicrobiano (BRUMFITT, HAMILTON-MILLER, 1989), e durante os anos 60,

verificou-se o aumento na frequência de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) em hospitais americanos, e de toda a Europa, com situação mais grave na Suécia e Dinamarca, onde 30% a 50 % dos isolados nosocomiais exibiam resistência a essa penicilina (PEACOCK, MARSIK, WENZEL, 1980).

A emergência deste fenótipo, particularmente em hospitais de grande porte, representa atualmente um problema no tratamento das estafilococcias hospitalares. As amostras de MRSA hospitalares, além de resistentes a todos os beta-lactâmicos são ainda multiresistentes (KLOOS, BANNERMAN, 1995, DIEDEREN, KLUYTMANS, 2006). A sua frequência aumentou de 2,4% em 1976 para 29,0% em 1991 (KORN *et al.*, 2001). Em hospitais de Nova Iorque é responsável por aproximadamente 30% das infecções hospitalares, e 50% daquelas associadas à mortalidade (SHOPSIN *et al.*, 2000).

Essa resistência é codificada pelo gene *mecA*, responsável pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) alterada, de 76kDa, de baixa afinidade aos β -lactâmicos, chamada de PBP2' ou PBP2a, presente na membrana plasmática da bactéria. O gene *mecA* encontra-se inserido em um cassete cromossômico *mec*, do *Staphylococcus* ("Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*" – SCC*mec*), um elemento de 21 a 67Kb de DNA, caracterizado pela presença de genes que codificam as recombinases CcrA e CcrB, contendo ainda segmentos de DNA associados, como seqüências de inserção (IS431) e transposons (Tn554) contendo genes de resistência a outros antimicrobianos (HIRAMATSU *et al.*, 2001)

O MRSA é um problema de abrangência mundial, com taxas de prevalência variando consideravelmente entre os países. São detectadas altas taxas nos Estados Unidos, América do Sul, Japão e Sul da Europa, enquanto na Escandinávia, Holanda e Suíça elas são baixas (KLUYTMANS-VANDERBERGH, KLUYTMANS, 2006),

variando de acordo com o tamanho e tipo de instituição (ROBERT, ETIENNE, BERTRAND, 2005).

No Brasil, a frequência de MRSA também é alta em hospitais de grande porte / universitários. Estudos realizados no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo relataram que 40% a 70% dos isolados pertencem a este fenótipo (TRINDADE, *et al.*, 2005), e de aproximadamente 50% naqueles do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (SADOYAMA, GONTIJO FILHO, 2000).

O primeiro caso de infecção por MRSA em UTIN, nos Estados Unidos, foi detectado em 1981, e posteriormente foram relatados vários surtos com predomínio de doença invasiva (MARY-HEALY *et al.*, 2004). Estes podem ser prolongados e de difícil solução pelas medidas de prevenção e controle de IHS convencionais, exigindo medidas adicionais, como uso tópico de mupirocina e o isolamento de coorte (GERBER, *et al.*, 2006).

Recentemente, emergiu o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/oxacilina de origem comunitária (*Community acquired MRSA*, “CA-MRSA”) associado a infecções graves em crianças na comunidade sem fatores de risco e sem hospitalização prévia (KUINT *et al.*, 2007), e posteriormente relatos da sua presença no ambiente hospitalar (SAX *et al.*, 2006). O CA-MRSA diferencia-se do MRSA hospitalar (*Hospital Acquired MRSA*, “HA-MRSA”) nas seguintes características: são isolados de pacientes hospitalizados nas primeiras 72 horas e sem histórico de hospitalização prévia recente, sensibilidade à maioria dos agentes antimicrobianos como clindamicina, sulfazotrim e rifampicina, cromossomo mec tipo IV ou V e presença de genes que expressam a proteína Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) (DAVID, *et al.*, 2006; FORTUNOV, *et al.*, 2006). PVL é codificado pelos genes, *lukS-PV* e *lukF-*

PV, respectivamente, exotoxina associada com pneumonia necrotizante, lesão de pele em humanos e inflamação grave em modelos animais (DIEP *et al.*, 2004.)

A presença dos genes PVL também pode ser detectada, em menor frequência, entre isolados de MSSA associados com toxinas da síndrome do choque (SSTIs). A análise filogenética de amostras de MSSA PVL positivas mostrou que pertencem a diferentes grupos, o que indica que o bacteriófago que carrega estes genes estão disseminados (CHINI *et al.*, 2006).

Os microrganismos mais frequentemente envolvidos em infecções em UTINs são Gram positivos, com destaque para o *Staphylococcus aureus*, tanto de infecções endêmicas quanto de surtos (BERTINI *et al.*, 2006). Ao contrário de boa parte dos surtos (GERBER *et al.*, 2006), nas infecções endêmicas não têm origem num reservatório/fonte comum, estando usualmente ligadas a microbiota do próprio paciente ou de profissionais de saúde, ou a contaminação das mãos destes últimos no exercício da profissão, ou ainda adquiridas pelo contato indireto com equipamento, instrumental e superfícies contaminadas (STILLMAN, WENZEL, DONOWITZ, 1987).

Enquanto o MSSA está entre os microrganismos mais associados a infecções em berçários e UTINs (STARLING, PINHEIRO, COUTO, 1993, ISAACS *et al.*, 2006) o MRSA é comumente associado a adultos, principalmente idosos (BOYCE, 1992, DENNISTON, ANDREW, RIORDAN, 2006). Entretanto, as taxas de infecções neonatais por este microrganismo podem variar de 15 a 26% em neonatos de UTINs, podendo atingir em algumas unidades até 50% das infecções por *S. aureus* (HRYNIEWICZ, ZAREBA, 1993, SAX *et al.*, 2006).

O controle de MSSA em UTINs é um desafio, considerando que a colonização por este microrganismo é comum entre neonatos e profissionais de saúde (BERTINI, *et al.*, 2006). No geral em pacientes hospitalizados ela é da ordem de 40 a 50% nos

hospitais dos EUA segundo Boyce (1992), com de risco de infecção em 10 a 60% desses pacientes (FARRINGTON, 1999). Entretanto, na Europa, a estimativa é que o adoecimento ocorra em menos de 10% dos pacientes colonizados (BARRET, MUMMERY, CHATTOPADHYAY, 1999).

A colonização do neonato por uma bactéria potencialmente patogênica como o *Staphylococcus aureus*, em particular a umbilical, é um risco para infecção neonatal. Por outro lado, profissionais de saúde portadores nasais de microrganismos como o *S. aureus* também podem ser importantes na epidemiologia de infecções por estes microrganismos (MATUSSEK, *et al.*, 2007).

A taxa de colonização por *S. aureus* no Berçário de Alto Risco (BAR) do HC-UFU é alta (aproximadamente 60%), sendo o MSSA mais freqüente (57%) do que o MRSA, e responsável pela maioria (>90%) das infecções por *S. aureus* na unidade (SILVA, 2003).

A tipagem epidemiológica é uma ferramenta sensível para determinar se um surto está associado a uma amostra epidêmica (MASLOW, MULLIGAN, 1996). Os métodos de tipagem de bactérias são classificados em fenotípicos e genotípicos (TENOVER, ARBEIT, GOERING, 1997). As técnicas genotípicas analisam o DNA cromossomal/plasmidial do microrganismo e apresentam maior reprodutibilidade e poder discriminatório das amostras, destacando-se as seguintes: perfil plasmidial, restrição plasmidial, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”, RFLP”), ribotipagem, eletroforese em campo pulsátil (“*Pulsed Field Gel Electrophoreses*”, PFGE) e as de reação em cadeia de polimerase (“*Polymerase Chain Reaction*”, PCR) (PODLORSKI, PERSING, 1995; MASLOW, MULLIGAN, 1996).

A técnica do PFGE é a mais usada para uma variedade de microrganismos,

incluindo bactérias Gram positivos, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*, e Gram negativas, tais como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (TENOVER *et al.*, 1994; WELLER, 2000; VILLARI, SARNATARO, IACUZO, 2000).

A tipagem molecular utilizada na identificação de *S. aureus* é útil, particularmente em situações epidêmicas, pois evidencia a presença de um clone predominante ou a policlonalidade e permite avaliar se se trata de transmissão pessoa a pessoa ou resulta da política uso de antimicrobianos (SAIMAN *et al.*, 2003).

A vigilância “*National Nosocomial Infections Surveillance System*” (NNISS) é a mais utilizada nos EUA, permitindo selecionar componentes por unidade ou topografia. No caso das UTIs, todos os pacientes são monitorados, por avaliação diária, quanto à presença de intervenções que podem aumentar o risco de infecção, tais como: prótese ventilatória, cateterizações do trato urinário e vascular central (GAYNES, HORAN, 1996). O componente correspondente a UTIN apresenta algumas particularidades em relação aos de terapia intensiva pediátrica e de adulto. A substituição de classificação pela gravidade, a sua estratificação de acordo com o peso ao nascer, a saber: menor ou igual a 1000gs, 1001 a 1500gs, 1501 a 2500gs e acima de 2500gs (GAYNES, *et al.*, 1991).

Entre as medidas de prevenção e controle de infecção hospitalar em neonatos mais importantes destacam-se: controle no uso de antibióticos, inquéritos de prevalência/incidência das IHS, monitoramento microbiológico da admissão, adesão a lavagem de mãos, isolamento de coorte, tratamento de profissionais de saúde e pacientes colonizados /infectados e protocolos para uso de procedimentos invasivos (DURAND *et al.*, 1986; BOYCE, 1992; SILVA *et.al.*, 2002).

Considerando a importância de *Staphylococcus aureus* em UTIs, e a falta de dados nacionais sobre a epidemiologia de infecções por este microrganismo, particularmente em relação ao MRSA, faz-se necessária uma investigação com a utilização de técnicas clássicas e moleculares, para que medidas de prevenção e controle possam ser implementadas de forma mais racional, contribuindo para diminuir a sua incidência.

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Comparar as taxas de infecções hospitalares, antes, durante e após uma reforma na unidade, realizada em 2003, nas taxas de infecções hospitalares, em relação aos anos anteriores (2001 e 2002), e seguintes (2004 e 2005), em instalações mais adequadas à demanda atual.

- Avaliar os fatores de risco intrínsecos e extrínsecos associados à colonização/infecção por *S. aureus* no período de janeiro/2004 a junho/2005;

- Avaliar as taxas de incidência de infecções hospitalares por *S. aureus* utilizando dois tipos de vigilância epidemiológica, NNISS e laboratorial por *S. aureus* no período de janeiro/2004 a junho/2005;

- Avaliar a sua prevalência de colonização assim como em diversos sítios anatômicos; no período de janeiro/2004 a junho/2005;

- Avaliar o padrão clonal (PFGE) de amostras provenientes de espécimes clínicos de infecção e de colonização dos neonatos, para verificar os seguintes aspectos:

- relação entre colonização e infecção;

- padrão endêmico/epidêmico dos diversos clones.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

1-Hospital

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), instituição de ensino com 500 leitos, com assistência de nível terciário. A unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do HC-UFU compreende onze leitos, tendo uma relação de enfermeira por paciente de 1:2. A unidade passou por reforma entre janeiro e setembro de 2003, visando a atender exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, bem como a demanda da Unidade.

2- Desenho do estudo

2-1-1- Estudo retrospectivo: Foi realizado um estudo retrospectivo, no período de janeiro/2001 a dezembro/2003, de busca de infecções hospitalares na unidade.

2-1-2- Estudo prospectivo: O estudo foi prospectivo, longitudinal, com busca de casos de infecção/colonização por *S. aureus* no período janeiro de 2004 a junho de 2005.

2-1-3- Estudo caso-controle: Foi realizado um estudo caso-controle para avaliação dos fatores de risco associados a colonização/infecção, com os casos envolvendo os neonatos colonizados ou infectados pelo *S.aureus* e os controles aqueles sem colonização por *S. aureus* e infecção por nenhum microrganismo.

2-2- Vigilância

2-2-1- Sistema NNIS

A vigilância de infecções hospitalares por *S. aureus* foi realizada por intermédio do sistema “*National Nosocomial Infections Surveillance System*” (NNISS) “*Centers for Disease Control and Prevention*” (CDC), USA (SIEGEL, 1998), por visitas diárias à unidade, com o preenchimento de uma ficha para cada neonato internado e acompanhamento até alta ou óbito (Anexo 1).

2-2-2- Laboratorial

As amostras de *S.aureus* isoladas de infecções foram obtidas durante visitas diárias ao laboratório de Microbiologia do HC-UFU, transportadas para o laboratório de Microbiologia do ARIMP (Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia) e estocadas.

2-3- Definição de Infecção Hospitalar (IH)

Infecção hospitalar é aquela que não está presente ou incubada no momento da admissão do neonato na UTIN, e se manifesta durante a hospitalização ou após 48 horas da transferência do neonato de uma outra unidade (EMORI, 1991); não são consideradas hospitalares as infecções adquiridas por via transplacentária e tornam-se evidentes após o nascimento (GARNER, 1998).

2-4- Colonização

Foram realizados dezoito inquéritos mensais de prevalência pontual de colonização por *S.aureus*, com a coleta de espécimes clínicos de todos os neonatos presentes na unidade, além de preenchimento de ficha individual com os dados pessoais,

demográficos, clínicos e fatores de risco intrínsecos e extrínsecos para cada criança (Anexo 2).

3. Técnicas microbiológicas

3-1. Coleta das amostras e espécimes clínicos

As amostras de *S. aureus* isoladas de espécimes clínicos foram obtidas no laboratório do hospital. A pesquisa de colonização por *S. aureus* foi realizada pela coleta de material a partir de narina e região perianal, com swab, transportados ao laboratório de microbiologia em tubos contendo TSB “*Trypticase Soy Broth*” (TSB).

3-2. Cultivo Primário

O swab foi inoculado em Ágar Manitol Salgado (*Biolife*), com e sem 6µg/ml de oxacilina, pela técnica de esgotamento, seguido de incubação a 37°C por 24 a 48 horas (KLOSS, BANNERMAN, 1995).

As amostras provenientes do laboratório do hospital foram subcultivadas em TSA (*Biolife*) acrescido de sangue de carneiro a 5%, seguindo-se incubação a 37°C por 24 a 48 horas para a análise de pureza, morfologia colonial e padrão de hemólise.

3-3- Estocagem das amostras

Todas as amostras obtidas de infecção e colonização foram estocadas, em tubos contendo TSB (*Biolife*) acrescidos de 20% de glicerol, e mantidas no freezer a -20°C.

3-4- Identificação das amostras

As amostras caracterizadas quanto as características morfo-tintoriais pelo método de Gram e identificadas pelos seguintes testes:

a) Catalase: foi verificada em lâmina de microscopia pela mistura da suspensão bacteriana com o peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de bolhas foi indicativa da presença da enzima. As amostras padrão *S. aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

b) DNA-se: foi realizada a inoculação em meio contendo DNA, (DNase test Ágar), seguindo-se a adição de 3ml de solução de azul de ortotoluidina a 0,1%; as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, e uma coloração rósea ao redor das colônias foi indicativo de um teste positivo, foi utilizada a ATCC 25923 de *S. aureus* como controle positivo da reação.

c) Coagulase: foram pesquisadas

- Coagulase ligada: utilizou-se o reagente *Staphyclin- Slidex Staphclin Latex agglutination test* (Laborclin, Paraná, Brasil).

- Coagulase livre: foi realizada a partir de colônias isoladas repicadas para tubo contendo plasma de coelho diluído 1:4 em solução salina. A leitura para verificação da produção ou não de coágulo foi feita em quatro horas após a incubação a 35 °C. Amostras padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3-5. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

3-5-1. Método de difusão em Ágar

O preparo do inóculo foi realizado pelo cultivo em ágar TSA a partir do qual três a cinco colônias foram inoculadas em 5 ml de caldo TSB, seguindo-se incubação a 37°C até atingir uma turvação equivalente a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde a uma concentração de aproximadamente $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por

mililitro (UFC/ml). A suspensão foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton com auxílio de swab, de modo a obter um crescimento confluyente. Os discos de antimicrobianos foram aplicados sobre a superfície da placa, seguindo-se incubação a 37°C, por 24 a 48 horas (CLSI, 2005).

Foram utilizados os seguintes discos (CECON) de antimicrobianos: cefoxitina (30µg), rifampicina (5µg), cefalotina (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg). A amostra padrão *S. aureus* 25923 foi utilizada como controle da técnica.

3-5-2. Ágar de triagem com oxacilina

Foi utilizado o ágar Mueller Hinton com 6µg de oxacilina e 4% de NaCl (ágar de triagem) para detecção de amostras resistentes de *S. aureus* (MRSA). Foi inoculado um volume de 5µL (5×10^6 UFC/ml) preparado como descrito no item anterior, utilizando-se uma placa para testar seis isolados. As culturas foram observadas após incubação por 24 horas a 37°C. A presença de crescimento de uma única colônia foi indicativo de resistência (CLSI, 2005).

4- Tipagem molecular

4-1. PCR

4.1.1 Obtenção do DNA bacteriano por meio de lise térmica

A liberação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Nunes e colaboradores (1999) com modificações. Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em ágar ("*Blood Agar Base*", Oxoid) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado foram transferidas para 100 µL de tampão TE (10mM Tris [Sigma, St. Louis, MO, EUA], 1mM EDTA [Sigma], pH 7,8). Essa suspensão foi mantida à

temperatura de ebulição, em torno 100°C, por dez minutos e, em seguida, centrifugada por 30 segundos, a 10.000 x g. Os sobrenadantes com DNA liberado foram coletados e usados para a reação de PCR.

4.1.2. Reação de PCR Multiplex– Identificação de *S. aureus* e *mecA*

A identificação das amostras de *S. aureus* foi realizada pela detecção de segmentos genômicos específicos, com detecção simultânea do gene *mecA*, conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2002), utilizando-se os oligonucleotídeos SA₁ (5' AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG^{3'}) e SA₂ (5' CGTAATGA GATTCAGTAGATAATACAACA^{3'}) (MARTINEAU *et al.*, 1998) para detecção de um fragmento espécie-específico de 108 pb de *S. aureus*; e MRS₁ (5' TAGAAATGACTGAACGTCCG^{3'}) e MRS₂ (5' TTGCGATCAATGTTACCTAG^{3'}) (SANTOS *et al.*, 1999) para detecção de um fragmento de 154 pb do gene *mecA*. A amplificação foi realizada em uma termocicladora (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Hamburgo, Alemanha), utilizando-se um volume total de 50µL para a reação composta de 5µL de DNA liberado por lise térmica, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (*Life Technologies*, São Paulo, Brasil), 12pmoles de cada um dos oligonucleotídeos SA₁ e SA₂, 1,6U de *GoTaq Flexi* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), 10 µL do tampão da enzima 5x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 2 mM de MgCl₂.

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por três minutos, foram realizados 30 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por cinco minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em TBE (0,89 M Tris [Sigma], 0,89 M ácido bórico [Madison, WI, EUA], 2,5mM EDTA [Sigma], pH 8,2), a 80V por 1:30 h. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a sua imersão em uma solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) por 45-60 minutos, sendo o gel fotografado sob luz ultravioleta. Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 100pb DNA ladder (Biotools).

4.1.3. PCR – Identificação de Leucocidina de Pantone Valentine

A identificação da Leucocidina de Pantone- Valentine foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos; PVL₁ (5'ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA^{3'}) e PVL₂ (5'GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC^{3'}), para detecção de um fragmento de 433pb correspondente ao gene *pvl*, conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2002), utilizando os parâmetros de reação e eletroforese descritos no item 4.1.2.

4-2. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

4-2-1- Extração do DNA genômico

A técnica utilizada foi a descrita por Nunes e colaboradores, 2005, com modificações. As amostras inicialmente foram cultivadas em meio de ágar-sangue a 35°C, por 48h. Posteriormente, cinco colônias isoladas foram inoculadas em 5ml de caldo TSB (Oxoid) e incubadas durante seis horas a 37°C. A seguir, 1ml desta suspensão foi centrifugado (700 xg por cinco minutos) e o sedimento ressuspenso em 250µL de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,6). A essa suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“*Low Melting Point Agarose*”, IBI Technical, New Haven, EUA) a 2%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes que foram

mantidos a 4°C por cerca de dez minutos. Posteriormente, os blocos de agarose foram colocados em 2ml de solução de lise EC (Tris-HCl 6mM pH 7,6, NaCl 1M, EDTA 100mM pH 7,5, Brij 58 0,5%, lauril sarcosinato de sódio 0,5%) contendo 50.000U de lisozima (Sigma) e 50U de lisostafina (Sigma) e incubados a 37°C, sob leve agitação, durante 18 a 24 h.

Após este período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução foi substituída por 2ml de solução ESP (EDTA 0,4M pH 9,5, lauril sarcosinato de sódio 1%) contendo proteinase K (Sigma) 0,1mg/ml, sendo essa mistura incubada a 50°C, em banho de imersão, sob leve agitação, durante 18 a 24h. Ao final desta fase, os blocos de agarose foram mantidos em nova solução ESP (sem proteinase) a 4°C.

4-2-2- Digestão com Endonuclease de Restrição

A digestão do DNA cromossômico foi realizada a partir de um bloco de agarose, lavado cinco vezes em tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 10mM, pH 7,5) a 37°C, sendo as quatro primeiras lavagens de 1h cada e a última de 18h. Após este processo, o bloco de agarose foi transferido para uma solução contendo 250µL do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (New England Biolabs Inc., UK) e incubados a 25°C, por 4h.

Em seguida, o bloco de agarose foi novamente transferido para um novo tampão da enzima de restrição contendo 20U da enzima *SmaI* e incubado a 25°C, durante 18-24h.

4-2-3- Eletroforese em Campo Pulsante

Posteriormente, foi removida a solução contendo a enzima e o bloco de agarose foi fundido a 70°C e aplicados no gel de agarose (Sigma) a 1% em tampão TBE 0,5x. O

gel foi processado por meio de eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35s, durante 23h a 6V/cm, a 13°C, com ângulo de 120°. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), por 30min, descorado por uma hora com água destilada, observado sob luz ultravioleta e posteriormente fotografado.

Os padrões de bandas foram analisados por intermédio da comparação visual entre as amostras e foram classificados de acordo com os critérios de Tenover *et al.*, (1995) e por análise automatizada pelo programa GelCompar II versão 3,5 (*Applied Maths, Bélgica*) usando o coeficiente Dice de similaridade e o método de “*Unweigthed Pair Group Method using Arithmetic Averages*” (UPGMA) para análise dos agrupamentos.

5. Análise estatística

A análise estatística dos fatores de risco para infecção e colonização foi realizada com o uso do teste de X^2 para comparação entre as variáveis qualitativas, o teste exato de Fisher para analisar as variáveis qualitativas com o n menor ou igual a 5 e o teste t de *Student* para analisar variáveis quantitativas. Estes dados foram analisados por meio do programa *Epi Info Software* versão 2000 (CDC, Atlanta).

Todos os fatores de risco para colonização/infecção por *S. aureus* avaliados na análise univariada foram reavaliados pelo modelo de regressão logística (análise multivariada) por meio do programa SPSS PC versão 11.0 (SPSS, Chicago).

6- Aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (n° do protocolo 122/2003) (anexo 3)

3- RESULTADOS

Foi realizado um estudo retrospectivo na UTIN do HC-UFU no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2003, com o objetivo de analisar o impacto desta reforma na taxa de infecção hospitalar da unidade, que teve duração de janeiro/2003 a Setembro/03, visando a atender às normas da Vigilância Sanitária e à demanda da Unidade.

Os resultados, tabelas e discussão deste estudo estão detalhados no artigo apresentado em anexo (Anexo 4).

Foi detectada diferença significativa na taxa de infecção hospitalar no período antes e após a reforma, sendo sepse a síndrome infecciosa mais frequentes nos dois períodos. A taxa de bacteremia relacionada ao cateter teve uma redução de 77,3 para 18,9 embora a densidade de utilização de cateter vascular central (CVC) aumentasse significativamente, de 0,18 para 0,55 nestes dois períodos.

No período de janeiro/2004 a junho/2005 foram realizados dezoito inquéritos de prevalência de colonização por *S. aureus*, compreendendo 162 neonatos, observando-se a sua presença em 12,9% (21/162), não sendo detectado nenhum neonato colonizado com o fenótipo MRSA (tabela 1). Foram isoladas 27 amostras de colonização, a maioria sendo recuperada da narina (66,6%); sendo que seis neonatos apresentaram-se colonizados nos dois sítios investigados (tabela 2).

Tabela 1: Colonização de neonatos por *Staphylococcus aureus* em 18 inquéritos de prevalência realizados na UTIN do HC-UFU de Janeiro/2004 a junho/2005.

Meses	Neonatos	Neonatos		Prevalência/Colonização			
	Investigados	Colonizados		MRSA		MSSA	
	N	N	%	N	%	N	%
Jan-jun/04	53	5	9,4	-	-	5	100,00
Jul-dez/04	51	6	11,7	-	-	6	-
Jan-jun/05	58	10	17,2	-	-	10	-
Total	162	21	12,9	-	-	21	100,00

Tabela 2: Colonização por MRSA e MSSA em diferentes sítios anatômicos em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/04 a junho/05.

Amostras	Sítios de Colonização					
	Narina		Intestino		Total	
	N	%	N	%	N	%
MRSA	-	-	-	-	-	-
MSSA	18	66,6	9	33,4	27	100,0

Dos 433 neonatos monitorados pelo Sistema NNISS, foram detectados 18 casos de infecção por *S. aureus*, envolvendo dezessete neonatos (um neonato apresentou dois episódios de infecção), apresentando uma incidência de infecção de 4,1% (tabela 3). A taxa de infecção por 1000 dias de hospitalização foi de 3,61 por 1000 pacientes dia, a densidade de utilização de CVC foi alta (0,66) e a taxa de bacteremia relacionada ao cateter foi de 11,80 (tabela 4). Dos dezoito casos, dois (11,1%) pertenciam ao fenótipo MRSA e dezesseis (88,9%) ao MSSA (figura 1).

Tabela 3: Incidência de infecções estafilocócicas na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/2004 –junho/2005.

Mês	Internações ¹	Episódios ²	
	N	N	%
Jan-fev/04	62	1	1,6
Mar-abr/04	56	3	5,3
Mai-jun/04	53	4	7,5
Jul-ago/04	41	3	7,3
Set-out/04	40	2	5,0
Nov-dez/04	56	1	1,7
Jan-fev/05	37	1	2,7
Mar-abr/05	43	2	4,6
Mai-jun/05	45	1	2,2
Total	433	18	4,1

¹Número de neonatos internados na unidade durante o mês, ²Número de infecções por *S.aureus*.

Tabela 4: Infecções hospitalares por *S. aureus* em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/04 a junho/05.

Variável	Taxa
Pacientes (N)	433
Paciente/dia	4976
Número de IHS	18
Taxa de incidência (%) ¹	4,1
Infecções/1000 pacientes dia ²	3,61
CVC/ dia	3305
Densidade de utilização de CVC ³	0,66
Bacteremia relacionada o cateter ⁴	11,80

¹Incidência: número de infecções/número de pacientes, ²Infecções/1000 pacientes dia: n° de infecções / paciente dia X 1000, ³DU: n° CVC dia / n° paciente dia, ⁴Bacteremia relacionada ao cateter: neonatos com sepse e cateter / n° CVC dia X 1000.

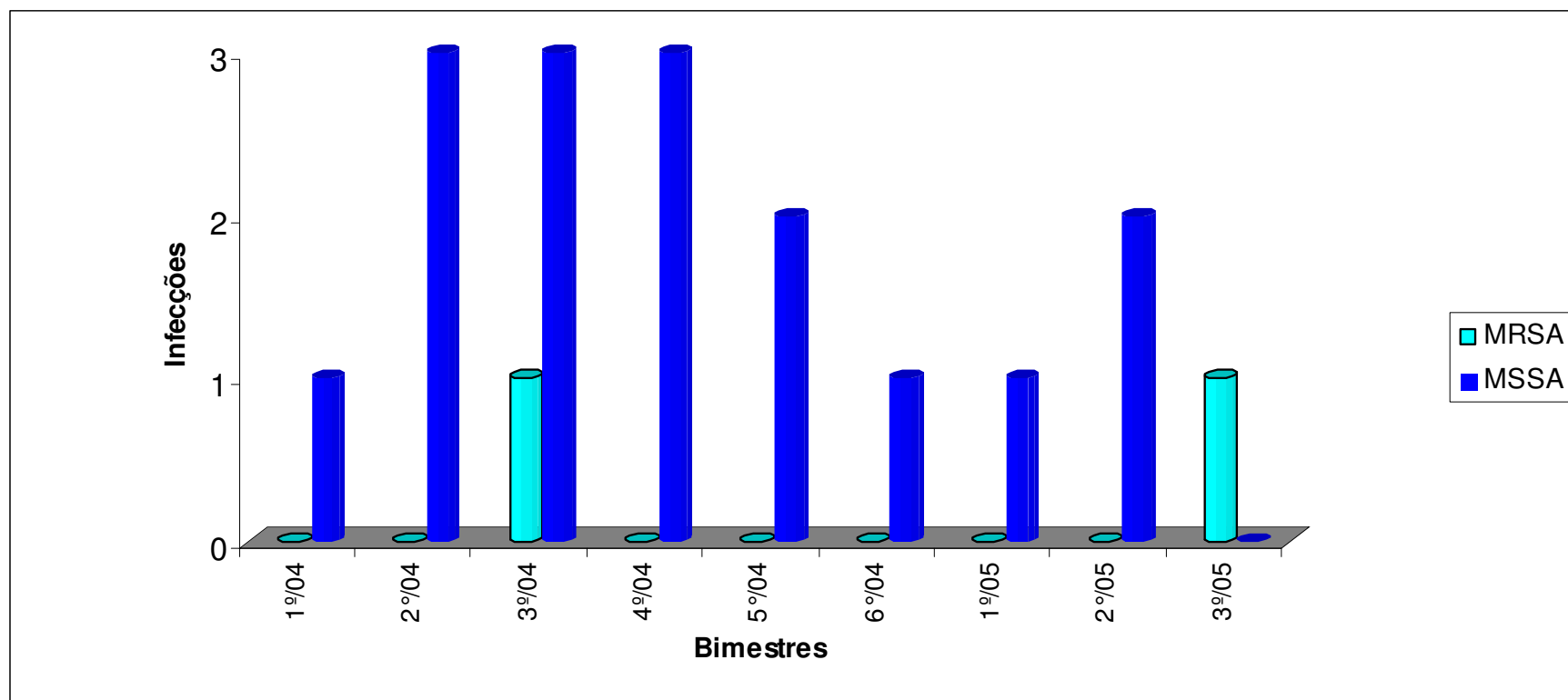


Figura 1: Distribuição dos casos de Infecção Hospitalar por *Staphylococcus aureus* na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/04 a junho/05.

As síndromes infecciosas observadas estão na tabela 5, com predomínio de episódios de sepse (61%), seguido de conjuntivite (33%) e 1 abscesso de partes moles (6,0%). Os dois casos por MRSA corresponderam a sepse (tabela 5).

Tabela 5: Infecções estafilocócicas segundo localização anatômica em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/04 a junho/05.

Infecção	Espécime clínico					
	MRSA (2)		MSSA (16)		Total (18)	
	N	%	N	%	N	%
Sepse	2	18,2	9	81,8	11	61,1
Conjuntivite	0	-	6	100,0	6	33,3
Abscesso	0	-	1	100,0	1	5,6

Entre os 32 neonatos incluídos no estudo, onze apresentaram-se infectados, quinze colonizados por *S. aureus* e seis evoluíram para o adoecimento e foram incluídos no grupo de infectados. A comparação entre o grupo caso (infectado/colonizado por *S. aureus*) e controle (sem colonização por *S. aureus* e sem infecção por nenhum microrganismo) apresentou como variáveis significantes: uso de antibióticos, utilização de CVC, uso por >7 dias bem como sua inserção por flebotomia (tabela 6). A avaliação por análise de regressão logística multivariada dos fatores de risco associados a colonização e/ou infecção por *S. aureus*, mostrou que somente a inserção do CVC por flebotomia foi significativo (IC_{95%}: 1,05 a 9,11).

Tabela 6: Estudo caso (colonização/infecção por *S.aureus*) versus controle em neonatos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/2004 a junho/2005.

Fatores de risco	Caso		Controle		p	OR ¹ (IC _{95%}) ²
	(n=32)		(n=310)			
	N	%	N	%		

Peso						
<1000g	6	18,7	30	9,7	0,13	2,07 (0,70 – 5,83)
1001-1500g	5	15,6	64	20,6	0,60	0,69 (0,22 – 1,97)
>1501g	21	65,7	216	69,7	0,86	0,87 (0,38 – 2,00)
Masculino	13	39,3	176	56,7	0,08	0,49 (0,22 – 1,09)
Apgar <5 no 5' de vida	2	6,2	36	11,6	0,55	0,49 (0,08 – 2,24)
IG ³ <26 semanas	1	3,1	20	6,45	1,00	0,94 (0,00 – 4,45)
Proced. Invasivos						
Entubação	19	59,3	129	41,6	0,11	1,90 (0,87 – 4,18)
SG ⁴	29	90,6	262	84,5	0,79	1,33 (0,42 – 4,68)
NP ⁵	20	62,5	140	45,1	0,13	1,87 (0,85 – 4,14)
CVP ⁶	22	68,7	240	77,4	0,24	0,58 (0,25 – 1,35)
Uso de CVC ⁷	23	71,8	152	49,0	0,03*	2,39 (1,04 – 5,92)
Uso CVC >7 dias	23	71,8	149	48,0	0,02*	2,49 (1,08 – 5,81)
Tipo de CVC						
Umbilical	3	9,3	35	11,3	1,00	0,79 (0,18 – 2,89)
PICC ⁸	10	31,2	88	28,3	0,97	1,10 (0,47 – 2,54)
Flebotomia	10	31,2	29	9,4	0,001*	4,21 (1,68 – 10,42)
Uso de antibiótico	27	84,3	182	58,7	0,01*	3,16 (1,20 – 8,82)

¹OR: Razoes de chance, ²IC: intervalo de confiança, ³ IG: idade gestacional, ⁴SG: sonda gástrica, ⁵ NP: nutrição parenteral, ⁶CVP: cateter vascular periférico, ⁷CVC: cateter vascular central, ⁸PICC: cateter central de inserção periférica.

*p≤ 0,05 (estatisticamente significante).

Foram recuperadas 45 amostras de colonização e infecção por *S. aureus* (18 de infecção e 27 de colonização). Nos dois isolados de MRSA, a multiresistência foi observada, com resistência a gentamicina além dos β -lactâmicos (cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona). Entre as amostras de MSSA verificou-se resistência somente a tetraciclina (tabela 7).

Tabela 7: Perfil de resistência das amostras de *S.aureus* pela técnica de difusão em gel.

Antimicrobiano	MRSA (2)		MSSA (43)	
	N	%	N	%
Cefalotina	02	100,0	-	-
Cefoxitina	02	100,0	-	-
Ceftriaxona	02	100,0	-	-
Ciprofloxacina	-	-	-	-
Clindamicina	-	-	-	-
Gentamicina	02	100,0	-	-
Rifampicina	01	50,0	-	-
Tetraciclina	01	50,0	4	9,3

A resistência a oxacilina foi confirmada pela detecção do gene *mecA* pela técnica do PCR multiplex, que também foi utilizado para a confirmação de *S. aureus* (figura 2). Foram ainda identificadas quatro amostras com o gene da Leucocidina de Panton Valentine, todas de MSSA provenientes de colonização de narina (figura 3).

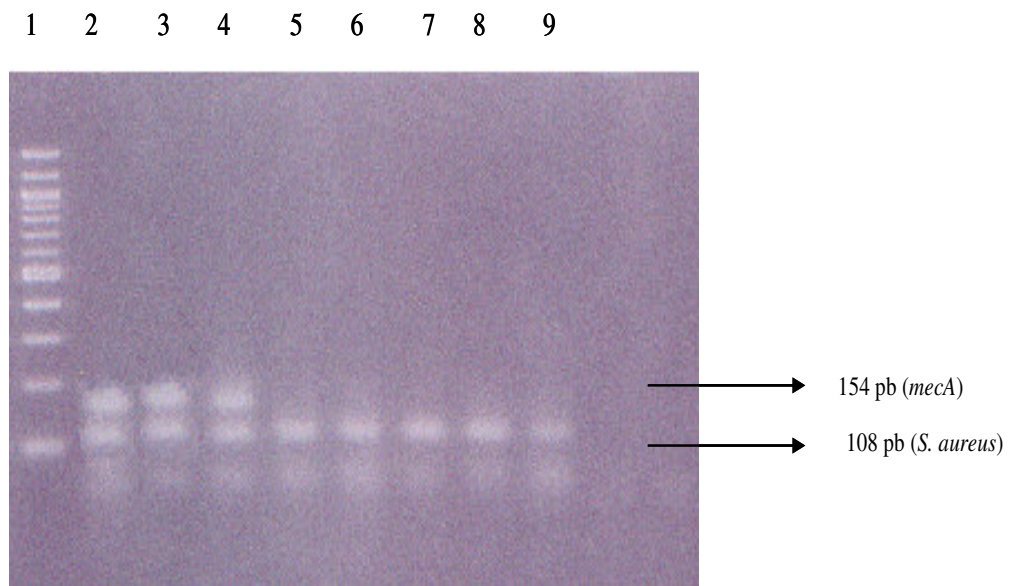


Figura 2: PCR Multiplex: Detecção de amostras de *Staphylococcus aureus* portadoras do gene *mecA*. Linhas 1: Padrão (100 pb DNA ladder); 2: *S. aureus* ATCC 33591; 3 e 4: Pacientes 31 e 32 (*mecA*+); 5 a 9: Pacientes 4, 7, 12, 23 e 24 (*mecA*-).

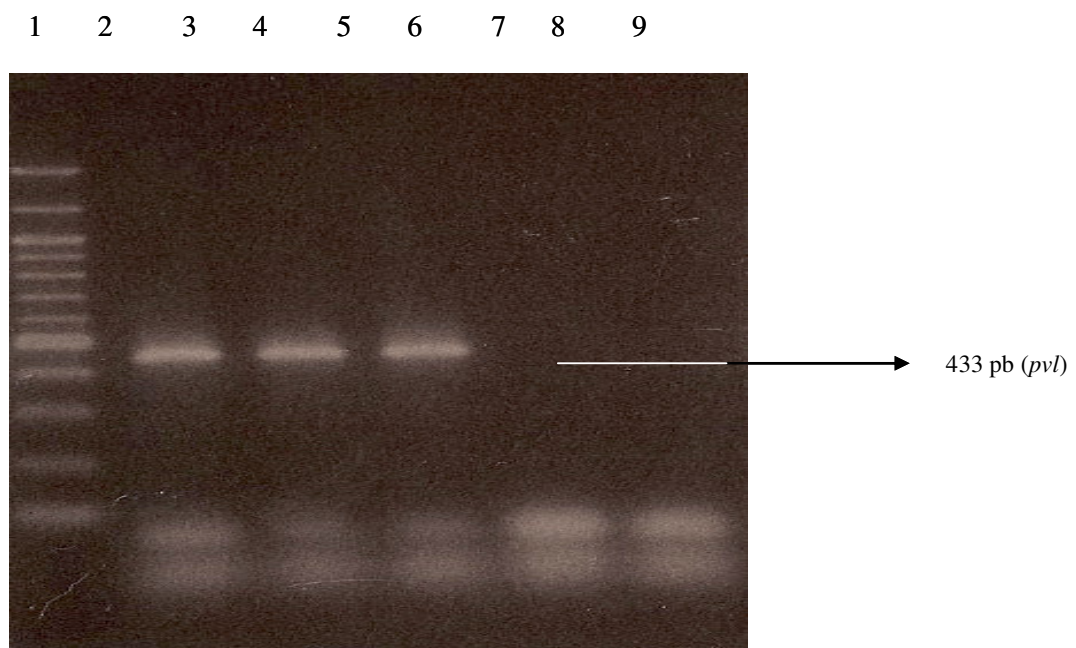


Figura 3: PCR: Detecção dos genes *pvl* em amostras de *Staphylococcus aureus*. Linhas: 1: Padrão (100 pb DNA ladder); 2: Amostra controle *pvl* + (*S. aureus* 523a); 3 e 4: Pacientes 11 e 25 (*pvl*+); 5 :Paciente 14 (*pvl*-); 6: Controle negativo da reação (*pvl*).

A análise dos perfis eletroforéticos foi realizada somente para as amostras de MSSA, aqueles neonatos que apresentaram colonização em dois sítios foi escolhido apenas um para a realização do PFGE, incluindo 37 amostras provenientes de 29 neonatos; quatorze infectados e quinze colonizados, com a exclusão de um neonato infectado pela impossibilidade de extração do DNA. As características clínicas destes neonatos com MSSA estão relacionadas na tabela 8.

O “DNA fingerprinting” por meio de técnica de PFGE evidenciou a policlonalidade das amostras de MSSA (Figura 4), com a presença de doze genótipos distintos (A-L) entre as 36 amostras analisadas. Seis neonatos que se apresentaram inicialmente colonizados evoluíram para adoecimento (infecção) pela detecção do mesmo clone, evidenciando uma identidade clonal entre estes isolados.

O clone B foi predominante, apresentando três sub- clones (B1, B2 e B3) recuperados de dez neonatos, cinco colonizados, três infectados e dois colonizados/infectados, foram caracterizados dois clusters por este clone, o primeiro (abril-agosto/2004) envolvendo três neonatos pelo sub clone B1 e B3, e o segundo (julho-abril/2004) com sete pelo sub-clone B2 (figura 5).

A figura 6b reúne amostras representativas de todos os clones encontrados, cujo dendograma correspondente está na figura 6b.

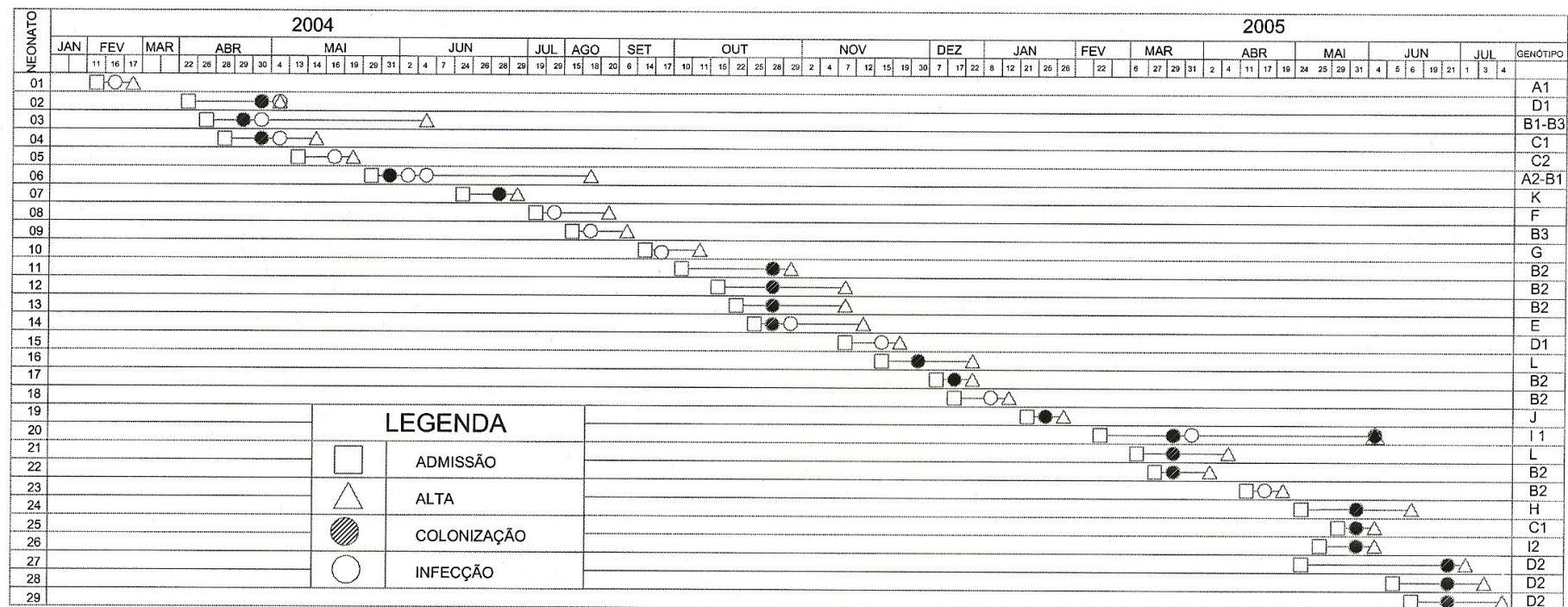


Figura 4: Distribuição dos neonatos colonizados e infectados por MSSA, na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/2004 a junho/2005.

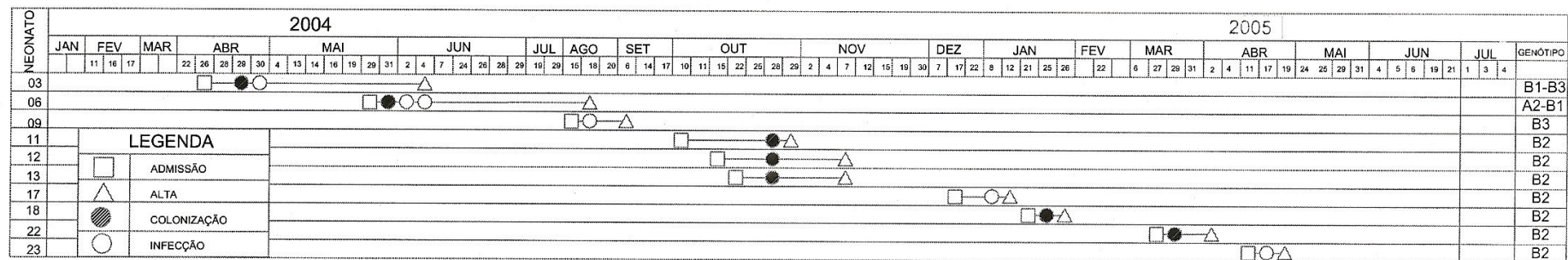


Figura 5: Distribuição dos neonatos colonizados e infectados por MSSA pelo clone B, na UTIN do HC-UFU, no período de janeiro/2004 a junho/2005.

Tabela 8: Colonização e infecção por MSSA em 29 neonatos na UTIN do HC-UFU, no período de Janeiro/2004 a junho/2005.

Paciente	N. de isolados	Doença de base	Fonte (C / I) ¹	Data do isolamento	Genotipo PFGE
1	1	Incompatib. ABO	Abscesso (I)	16/02/04	A1
2	2	Prematuridade	Narina(C)/ Conjuntivite (I)	30/04/04- 04/05/04	D1
3	2	Hidrocefalia	Anus (C)/ Conjuntivite (I)	29/04/04- 31/04/04	B1, B3
4	2	SMH	Narina (C)/Sangue (I)	30/04/04- 01/05/05	C1
5	1	SAP	Conjuntivite (I)	13/05/04	C2
6	3	SMH	Narina(C)/ Sangue (I)/ Conjuntivite (I)	31/05/04- 02/06/04- 07/06/04	A2, B1, A2 ²
7	1	SMH	Anus (C)	28/06/04	K
8	1	Prematuridade, SMH	Sangue (I)	29/07/04	F
9	1	SAP	Sangue (I)	18/08/04	B3
10	1	Prematuridade	Sangue (I)	17/09/04	G
11	1	Pneumotorax	Narina (C)	28/10/04	B2
12	1	SMH	Anus (C)	28/10/04	B2
13	1	Hidrocefalia	Anus (C)	28/10/04	B2
14	2	Prematuridade	Narina (C)/ Sangue (I)	28/10/04- 30/10/04	E
15	1	Pneumotorax	Conjuntivite (I)	15/11/04	D1
16	1	Prematuridade	Narina (C)	30/11/04	L
17	1	Atresia de esofago	Narina (C)	17/12/04	B2
18	1	Pneumotorax	Sangue (I)	08/01/05	B2
19	1	SMH	Anus (C)	25/01/05	J
20	3	Hidrocefalia, Tumor cerebral	2 Narina (C)/ Sangue (I)	29/03/04- 31/05/04- 04/06/05	I ₁
21	1	SMH, anoxia	Anus (C)	29/03/05	L
22	1	Desnutrição	Narina (C)	29/03/05	B2
23	1	Crise convulsiva	Sangue (I)	17/04/05	B2
24	1	Tocotraumatismo	Narina (C)	31/05/05	H
25	1	SMH	Narina (C)	31/05/05	C1
26	1	SAP	Narina (C)	31/05/05	I2
27	1	Hipertensao pulmonar	Narina (C)	21/06/05	D2
28	1	Hipoglicemia	Narina (C)	21/06/05	D2
29	1	SAP	Narina (C)	21/06/05	D2

¹C/I , colonização/infecção; ² O mesmo clone A2 foi isolado da narina e conjuntivite, SMH: Síndrome da membrana hialina, Síndrome adaptativa pulmonar.