



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEXANDRE CASONATTO

**COLONIZAÇÃO DO BINÔMIO MÃE-CRIANÇA POR
STAPHYLOCOCCUS AUREUS COMUNITÁRIO**

Londrina
2020

ALEXANDRE CASONATTO

**COLONIZAÇÃO DO BINÔMIO MÃE-CRIANÇA POR
STAPHYLOCOCCUS AUREUS COMUNITÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Dário Capobiango.

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C719 Casonatto , Alexandre .
COLONIZAÇÃO DO BINÔMIO MÃE-CRIANÇA POR *Staphylococcus aureus*
COMUNITÁRIO / Alexandre Casonatto . - Londrina, 2020.
90 f. : il.

Orientador: Jaqueline Dario Capobiango.
Coorientador: Marcia Regina Eches Perugini.
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020.
Inclui bibliografia.

1. 1. *Staphylococcus aureus* - Tese 2. CA-MRSA - Colonização mãe-criança- Tese 3. Caracterização molecular Tese. 1 Capobiango, Jaqueline Dario. II. Perugini, Marcia Regina Eches. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. - Tese. I. Dario Capobiango, Jaqueline . II. Regina Eches Perugini, Marcia . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

ALEXANDRE CASONATTO

**COLONIZAÇÃO DO BINÔMIO MÃE-CRIANÇA POR
STAPHYLOCOCCUS AUREUS COMUNITÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Dario
Capobiango
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eliana Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Rosangela Ferrari Pimenta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sueli Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 3 de julho de 2020.

DEDICATÓRIA

A Deus

Dedico este trabalho de forma especial a Ele, que nos guia, protege em todas as etapas de nossas vidas.

À minha mãe

Rosicleia Fernandes por todo carinho, amor, companheirismo, apoio e dedicação.

Aos meus filhos

Rafael Casonatto e Emanuel Casonatto pelo amor incondicional e inspiração.

À Profa. Dra. Jaqueline Dário Capobiango

Exemplo de ser humano e profissional. Obrigado pela honra de ser seu aluno.

À Profa. Dra. Márcia R. E. Perugini

Exemplo de ser humano e profissional. Obrigado pela honra de ser seu aluno.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do

Mestrado Agradeço de forma especial a todos os professores do Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial pelos ensinamentos, apoio e carinho que nos

prestaram ao longo do caminho.

Aos amigos e familiares

Agradeço a todos os amigos e familiares pelo exemplo de vida, pelas palavras acalentadoras e auxílio.

Aos colegas do

Mestrado Agradeço aos colegas do mestrado em fisiopatologia clínica e laboratorial e NIP5 pela partilha de amizade e conhecimento ao longo desses anos.

Aos Servidores do HUL-UEL e CCB

Agradeço a todos os servidores do HUL e CCB pelo carinho, apoio e auxílio.

À Banca

Examinadora Agradeço a Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero, Profa. e Profa Dra. Gilselena Kerbauy Lopes pela honra de aceitar o convite de compor à banca examinadora.

Aos

Orientadores Agradeço a Profa. Dra. Jaqueline Dário Capobiango e Profa Dra. Marcia Regina Eches Perugini pelos conhecimentos transmitidos; apoio; generosidade e carinho.

Aos Órgãos de Fomento

Agradeço de forma especial a FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pelo incentivo a essa pesquisa.

CASONATO, Alexandre. **Colonização do binômio mãe-criança por *Staphylococcus aureus* comunitário**. 2020. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O principal local de colonização de *Staphylococcus aureus* é o vestíbulo nasal (ou narinas anteriores) e na população geral a prevalência de colonização é de aproximadamente 20 a 30%. O *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associado a comunidade (CA-MRSA) é uma ameaça global emergente em saúde pública por causar infecções invasivas leves e potencialmente fatais como a pneumonia necrotizante. Além disso, a incidência de infecções por CA-MRSA é maior em crianças. A admissão hospitalar de crianças colonizadas por *S. aureus* podem ser uma fonte de transmissão e propagação do *S. aureus* neste ambiente. O objetivo desse estudo foi avaliar a prevalência de colonização por *S. aureus* em crianças admitidas no Pronto Socorro Pediátrico do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL). As amostras de swab foram coletadas da mucosa de boca e narinas, axilas e virilhas de 200 crianças e suas respectivas mães, de maio de 2018 a abril de 2019. *S. aureus* foi identificado por metodologias fenotípicas e moleculares. Foram realizados testes fenotípicos para avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos e testes moleculares para detecção de genes de resistência e de virulência. Em 32,5% das crianças foi detectada a presença de *S. aureus*, sendo 35,4% MRSA. Em 43 mães (21,5%) foi detectada a presença de *S. aureus*, 17 amostras eram MRSA (39,5%). A colonização do binômio mãe-criança 46,5% (OR: 2,164 [IC 95% 1,083-4,323], $p = 0,027$). As crianças com idade maior ou igual a seis anos apresentaram maior frequência de colonização por *S. aureus* em relação às crianças menores de seis anos (OR: 0,423 [IC 95% 0,230-0,778], $p = 0,005$), porém as crianças menores de 6 anos apresentaram maior frequência (44,6%) de MRSA (65,2%). Três isolados de MRSA (12%) apresentaram resistência a cefoxitina, sendo o gene *mecA* positivo (OS-MRSA). O gene *SCCmec IV* foi detectado em 11/23 (47,8%) amostras e foi o mais frequente. A maioria dos isolados de MSSA e MRSA foram positivos para o gene *icaA*, que codifica a produção de biofilme. Foi detectada a presença de *Panton-Valentine Leucocidina* (PVL) em 11/25 (44%) dos isolados de MRSA. Em relação aos isolados MSSA, 19 (48,7%) apresentavam PVL. A presença de colonização por CA-MRSA em crianças atendidas em um pronto-socorro público de referência, no norte do Paraná, demonstra o risco elevado desta população adentrar com esse microrganismo no ambiente hospitalar, propiciando a disseminação do mesmo para outros pacientes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Criança. *Staphylococcus aureus* resistente à Metilina.

CASONATO, Alexandre. ***Staphylococcus aureus* community colonization in the mother-child binomial**. 2020. 91 p. Dissertation (Master's in Clinical and Laboratory Phatophysiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The main colonization area of *Staphylococcus aureus* is the frontal nostril, and in general population the colonization prevalence is approximately 20 to 30%. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated to community (CA-MRSA) is an emerging global threat on public health system for causing light-invasive infections to potentially fatal ones, for instance Necrotizing Staphylococcal Pneumonia. Besides, CA-MRSA infection occurrences is higher on children. *S. aureus* colonized children hospital admission could be the transmission and propagation source of this bacteria in such setting. The goal of this research was to evaluate the colonization prevalence by *S. aureus* on children admitted on the Pediatric Hospital's emergency of Londrina's University Hospital. Swab samplings were collected from mouth and nostrils' mucosa, armpits, and groin area of 200 children and their respective mothers, from May/2018 to April/2019. Phenotypic and molecular methodologies identified *S. aureus* in this research. Phenotypic tests were done to evaluate the resistance profile to antimicrobial medicine, and molecular tests to detect resistant virulent genes. *S. aureus* was detected in 32,5% of the children tested, 35,4% being MRSA. *S. aureus* was detected in 43 mothers (21,5%), 17 samples were MRSA (39,5%). In relation to the binomial mother-child colonization, 46,5% of the mothers were colonized by *S. aureus*, just like their own children (OR: 2,164 [IC 95% 1,083- 4,323], $p = 0,027$). Children on or above six years old presented higher colonization rate, comparing to children younger than 6 years of age (OR: 0,423 [IC 95% 0,230- 0,778], $p = 0,005$), however those children presented higher MRSA frequency. Three isolated MRSA cases (12%) showed cefoxitin resistance, of which being *mecA*- positive gene (OS-MRSA). *SCCmec IV* gene was detected in 11/23 samples (47,8%) and it was the most frequent. Most of the MSSA and MRSA isolates have been positive for the *icaA* gene, which codes biofilm production. The presence of PVL was detected in 11/25 (44%) of the MRSA samples. Regarding MSSA strains, 19 of them (48,7%) presented PVL. CA-MRSA colonization presence on children assisted at public reference hospital's emergency, on the north of Paraná, demonstrates the high risk of this population to enter on a hospital environment with this microorganism, providing its dissemination.

Key words: *Staphylococcus aureus*. Child. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição de mães e crianças colonizadas ou não por *Staphylococcus aureus* (n=400).....38
- Figura 2** – Caracterização dos 64 isolados de *Staphylococcus aureus* comunitários, provenientes de crianças. Sensibilidade a cefoxitina, presença do gene *mecA* e tipagem dos elementos SCCmec.....53
- Figura 3** – Características moleculares de 21 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) por REP-PCR, tipagem SCCmec e genes de virulência56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Associação das variáveis clínico-demográficas e colonização materna com crianças colonizadas e não colonizadas por *Staphylococcus aureus* (n=200) Londrina, PR, Brasil, 201940
- Tabela 2** – Associação das variáveis clínico-demográficas em relação a colonização de crianças por *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à oxacilina, Londrina, PR, Brasil, 201941
- Tabela 3** – Associação das variáveis clínico-demográficas e colonização materna por *Staphylococcus aureus*, Londrina, PR, Brasil, 2019 ..42
- Tabela 4** – Perfil de sensibilidades aos antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à oxacilina, Londrina, PR, Brasil, 201943
- Tabela 5** – Análise da associação dos genes de virulência *luks-PV* / *lukF-PV*, *tsst* e *icaA* e resistência a meticilina entre 25 amostras de MRSA e 39 de MSSA, isolados de crianças (n=329)55
- Tabela 6** – Frequência de genes de virulência de 21 amostras de *Staphylococcus aureus* *mecA* positivo de acordo o tipo de SCCmec.....56
- Tabela 7** – Caracterização do complexo clonal e sequence typing de sete isolados MRSA SCCmec tipo IV57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Agr</i>	Regulador de Genes Acessórios
<i>blaZ</i>	Gene codificador de penicilinases
CIM	Concentração inibitória mínima
COA	Secreção coagulase
CLSI	Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing
CA-MRSA	<i>Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEP/UEL	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina
<i>Ccp</i>	Proteína de controle catabolico
<i>CodY</i>	Inibidor de genes metabolismo de nitrogênio
<i>dfrA</i>	Gene codificador de resistência a trimetoprim
<i>dfrk</i>	Gene codificador de resistência a trimetoprim
EUA	Estados Unidos da América
EPS	Exopolissacarídeos
<i>ermC</i>	Gene codificador de resistência a eritromicina e clindamicina
HA-MRSA	<i>Healthcare-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
hVISA	<i>Heteroresistant Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
<i>ica</i>	Operon relacionado com a produção de biofilme
<i>icaA</i>	Gene que relacionado com a produção de biofilme
<i>icaB</i>	Gene que relacionado com a produção de biofilme
<i>icaC</i>	Gene que relacionado com a produção de biofilme
<i>icaD</i>	Gene que relacionado com a produção de biofilme
<i>lukS-PV</i>	Gene que codifica a leucocidina de Panton-Valentine
<i>lukF-PV</i>	Gene que codifica a leucocidina de Panton-Valentine
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<i>mecA</i>	Gene relacionado à resistência à meticilina
<i>mec</i>	Gene relacionado à resistência à meticilina
<i>mecC</i>	Gene relacionado à resistência à meticilina
<i>mecD</i>	Gene relacionado à resistência a meticilina

MHA	Mueller Hinton ágar
NAG	N-acetil glicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
NaCl	Cloreto de sódio
NIP5	Laboratório de biologia molecular de microrganismos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS-MRSA	Oxacilina-sensível mecA-positivo Staphylococcus aureus
PBP	Penicillin binding protein
PBP2a	Penicillin binding protein 2a
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PVL	Panton-Valentine leukocidin
Rot	Produtor de gene hot
Rex	Redox-Responsive Repressor Rex
RpiRc	Repressor de leucocidinas
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec
Sar	Regulador Acessório Estafilocócico
Sae	Complexo de transcrição sae
SrrA	Sistema regulador dos fatores de virulência
tetK	Gene codificador de resistência a tetraciclina
tetL	Gene codificador de resistência a tetraciclina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TSB	Tryptone Soya Broth
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TSST	Toxic shock syndrome toxin
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
VISA	Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	13
1.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	14
1.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	16
1.4	FATORES DE RISCO.....	17
1.5	TRATAMENTO.....	18
1.6	EPIDEMIOLOGIA.....	20
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	25
4.2	DELINEAMENTO.....	25
4.3	CÁLCULO DA AMOSTRA.....	25
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	26
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	26
4.6	MÉTODOS FENOTÍPICOS	26
4.6.1	Coleta das Amostras	26
4.6.2	Isolamento e Identificação Fenotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
4.6.3	Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	27
4.6.4	Avaliação da Sensibilidade à Oxacilina em Meio Suplementado	27
4.6.5	Triagem para Identificação de Resistência a Oxacilina em Ágar Diluição.....	28
4.6.6	Triagem para Identificação de Isolados hVISA.....	28
4.6.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Oxacilina	28
4.6.8	Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Vancomicina	29
4.6.9	Reativação dos Isolados.....	29
4.7	MÉTODOS GENOTÍPICOS.....	29

4.7.1	Extração de DNA.....	29
4.7.2	PCR Convencional	29
4.7.3	Genotipagem	30
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4.9	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
5	RESULTADOS	31
5.1	ARTIGO 1 – COLONIZAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM CRIANÇAS DA COMUNIDADE, NO PARANÁ	32
5.2	ARTIGO 2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A METICILINA ADQUIRIDO NA COMUNIDADE (CA-MRSA) DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL	50
6	CONCLUSÕES	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES	78
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Criança	79
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Mãe..	81
	APÊNDICE C – Questionário para Coleta de Dados.....	83
	APÊNDICE D – Instrumento de Análise Fenotípica	85
	ANEXOS	87
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Staphylococcus é um gênero de bactérias anaeróbias facultativas que se apresenta na forma de cocos gram-positivos, com tamanho aproximado de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. Podem se agrupar na forma de cachos, aos pares, em tétrades ou em cadeias curtas (JORGENSEN et al., 2015). Esse gênero pertence à família *Staphylococcaceae*, que é composta por 51 espécies e 28 subespécies. Esses microrganismos se desenvolvem bem em condições adversas, como em ambientes com baixa umidade ou elevada pressão osmótica. Possuem elevada flexibilidade nutricional e apresentam capacidade de sobrevivência e multiplicação sob diferentes condições ambientais (DSMZ, 2015).

Staphylococcus aureus é um microrganismo comensal que pode ser encontrado em pessoas saudáveis, mas também é causa frequente de infecções graves. Frequentemente coloniza superfícies epiteliais e mucosas de várias regiões do corpo, como narinas anteriores, garganta, axila, virilha, reto, vagina e períneo (ABDULGADER et al., 2019).

O principal local de colonização do *S. aureus* é o vestíbulo nasal (ou narinas anteriores), e na população geral a prevalência de colonização varia de 20 a 30% (CHEN et al., 2017; DEN HEIJER et al., 2013; GORWITZ et al., 2008; SAADATIAN-ELAHI et al., 2013). São bactérias mais abundantes na microbiota nasal adulta (FRANK et al., 2010; KASPAR et al., 2016; YAN et al., 2013).

Três padrões de transporte nasal foram descritos na literatura: portadores persistentes 10% a 30%, não portadores 10% a 47%, e outros são considerados portadores intermitentes (MUTHUKRISHNAN et al., 2013; NOUWEN et al., 2004).

S. aureus apresenta a capacidade de formar coágulos quando inoculados no plasma sanguíneo humano. Através desse mecanismo as espécies de *S. aureus* são classificadas em coagulase-positiva e coagulase-negativa. Em cepas de fenótipos coagulase-positiva, a secreção coagulase (COA) liga-se a protrombina e altera o sítio alvo da enzima através da inserção de seus resíduos N-terminais na bolsa de ativação, proporcionando a clivagem do fibrinogênio em fibrina (FRIEDRICH et al., 2003). A ligação do complexo COA-Protrombina converte o fibrinogênio em fibrina insolúvel formando a rede de malha de um coágulo (KROH; PANIZZI; BOCK, 2009).

S. aureus é considerado um patógeno oportunista, podendo causar desde infecções leves de pele a doenças invasivas como pneumonia, endocardite e osteomielite (PAN et al., 2019).

O êxito do *S. aureus* em colonizar e causar doenças em seu hospedeiro deve-se aos fatores de virulência que participam na adesão, aquisição de nutrientes e na evasão da resposta imune do hospedeiro (SAKR et al., 2018).

1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recentemente classificou a resistência aos antimicrobianos como uma séria ameaça à saúde mundial. *S. aureus* está entre os patógenos humanos mais frequentes e letais devido a sua capacidade de desenvolver resistência a múltiplos fármacos (PATERNINA-DE LA OSSA et al., 2018).

O surgimento da penicilina (1928) foi importante para combater infecções graves. Contudo, dois anos após o seu uso, isolados de *S. aureus* já se apresentavam resistentes ao fármaco (NOVICK; BOUANCHAUD, 1971).

No final da década de 50 foi desenvolvida a meticilina, uma penicilina semissintética que possui adição de um radical do grupo funcional carbono α do anel betalactâmico. Após dois anos do seu surgimento, foram relatados os primeiros casos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (HARTMAN; TOMASZ, 1981).

O mecanismo de resistência à meticilina ocorre por mudança no sítio de inserção para o antimicrobiano, denominado *Penicillin-Binding Protein* (PBP) (HARTMAN; TOMASZ, 1981).

A proteína alterada, PBP2a ou PBP2' é responsável por fazer a ligação da ponte cruzada de pentáglicina entre o 3° e o 4° aminoácidos, *L-lisina* e *D-alanina*, respectivamente, das cadeias laterais de *N-acetil glicosamina* (NAG) e *ácido N-acetilmurâmico* (NAM) para formação da parede celular bacteriana (SASSINE et al., 2017).

A baixa afinidade aos antibióticos B-lactâmicos produzidos pelas PBP's, confere resistência à oxacilina e meticilina, bem como resistência cruzada a todos os antibióticos B-lactâmicos e esse mecanismo é codificado pelo gene *mecA*. Este gene faz parte do complexo *mec* (juntamente com seus reguladores *mecR1* e *mecI*) e está

localizado em um elemento genético móvel chamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) (LIU et al., 2016).

Além disso, o SCC*mec* carrega o complexo *ccr* (*ccrA* e *ccrB*) que codifica as recombinases responsáveis pela mobilidade do cassete. A combinação da complexidade do gene *mec* e do alótipo do gene *ccr* é utilizada para tipagem genética do SCC*mec* (BAIG et al., 2018; WU et al., 2015).

Até o momento, 13 tipos SCC*mec* (indicados pelos algarismos romanos I a XIII) e três genes *mec* (*mecA*, *B* e *C*) foram identificados entre *S. aureus* no mundo (HIRAMATSU et al., 2013; KAYA et al., 2018).

Os isolados de MRSA eram inicialmente restritos ao ambiente hospitalar, denominadas *Healthcare-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (HA-MRSA), porém, nos últimos anos, surgiram MRSA adquiridos na comunidade, ou *Community-associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Geralmente as isolados HA-MRSA transportam SCC*mec* do tipo I, II e III, enquanto os CA-MRSA transportam os tipos IV e V (KAYA et al., 2018).

Recentemente um novo perfil de resistência foi identificado, trata-se de *S. aureus* que se apresenta fenotipicamente sensível à oxacilina e genotipicamente é portador do gene *mecA*, denominado *Oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus* (OS-MRSA). Essa característica do microrganismo pode levar a resultados falso-negativo dos testes de sensibilidade e indução à falha terapêutica (ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016).

Outro antibiótico frequentemente empregado como tratamento de primeira linha para infecções graves causadas por MRSA é a vancomicina. Embora a suscetibilidade entre MRSA permaneça próxima de 100%, há um relato crescente de isolados sensíveis à vancomicina que exibem um fenótipo heterorresistente (MARTIROSOV et al., 2017).

Heterogeneous Vancomycin-Intermediate S. aureus (hVISA) é definido pela presença de uma subpopulação de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina. De acordo com CLSI (2018), *S. aureus* com concentração Inibitória mínima (CIM) ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ são considerados sensíveis, CIM 4-8 $\mu\text{g/mL}$ são intermediários e CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ são resistentes para o antimicrobiano.

Geralmente infecções por hVISA estão relacionadas à assistência à saúde, e novos estudos epidemiológicos são necessários para descreverem dados atuais

sobre a sua prevalência global. Esses parâmetros são primordiais para a vigilância de possível disseminação do hVISA.

Contudo, o desafio não está exclusivamente na identificação dos mecanismos de resistência dos isolados MRSA e hVISA. Outros perfis identificados em sequências de inserção de transposons e plasmídeos (penicilina [*blaZ*] trimetoprim [*dfrA* e *dfrK*], eritromicina [*ermC*], clindamicina [*ermC* constitutivamente expressa] e tetraciclinas [*tetK* e *tetL*]) foram encontrados tanto em MRSA como em MSSA (MALACHOWA; DELEO, 2010).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

S. aureus expressam ampla quantidade de fatores de virulência, incluindo toxinas (hemolisinas e leucocidinas), fatores de superfície imuno-evasivos (biofilme e proteína A), enzimas que promovem invasão tecidual (hialuronidase), catalase, coagulase, entre outros (TURNER et al., 2019).

Os genes de virulência podem estar agrupados através das Ilhas de Patogenicidades de *S. aureus* (SaPIs), e geralmente contém dois ou mais genes superantígenos, tais como a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*Toxic Shock Syndrome Toxin 1* – TSST1) e as enterotoxinas do tipo B e C, que estão associadas à síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar, respectivamente (UHLEMANN et al., 2014).

Outro determinante de virulência frequentemente estudado é a proteína *Panton-Valentine Leucocidina* (PVL), que está associada à pneumonia necrotizante e infecção dos tecidos moles. Além disso, PVL tem sido bem descrita como um marcador epidemiológico nas infecções por CA-MRSA, devido a sua alta prevalência quando comparada ao HA-MRSA (THOMSEN et al., 2019).

Na natureza, quase 90% dos microrganismos são capazes de formar biofilme, esse mecanismo de virulência confere um importante fator de proteção através das substâncias poliméricas extracelulares (EPSs) (LUAN et al., 2019). Com isso, as EPSs produzem uma barreira que contribui para a menor sensibilidade e maior resistência aos antimicrobianos (HALL; MAH, 2017).

O operon *ica* de *S. aureus* contém quatro genes (*ica ABCD*) organizados em uma estrutura denominada *operon-like*. Contudo, a formação das EPSs e proteínas

se dá, principalmente, pela presença do operon transportador do gene *icaA* (MOULAVI et al., 2019).

Das muitas espécies de estafilococos, *S. aureus* evoluiu expressivamente como a mais virulenta, em decorrência de determinantes coordenadamente regulados por vários fatores de transcrição, como: *AgrA*, *SaeR*, *Rot* e *SarA* (JENUL; HORSWILL, 2018). Paralelamente, um conjunto separado de fatores de transcrição (*CcpA*, *CcpE*, *CodY*, *RpiRc*, *SrrA* e *Rex*) age controlando a expressão de enzimas em várias vias metabólicas, e influenciam direta e indiretamente as funções dos reguladores de genes de virulência (RICHARDSON, 2019).

Os fatores de virulência de *S.aureus* são de extrema importância para a sua sobrevivência, no entanto, esse processo exige adaptação significativa que promoverá danos ao seu hospedeiro.

1.4 FATORES DE RISCO

Os riscos impostos por MRSA trouxeram uma nova percepção sobre a importância de conhecer melhor sua diversidade genética, epidemiológica, evolutiva. Além disso, é importante saber que a colonização está relacionada com 50% a 80% dos casos de infecções. (CLARRIDGE et al., 2013). Devido à alta crescente de colonizados, pesquisadores tem se desempenhado em elucidar fatores de riscos para colonização e infecção na população geral.

Os fatores ambientais, o perfil populacional e o transporte cruzado tem papel importante na disseminação do CA-MRSA e HA-MRSA. Estudos de Coorte descrevem vários fatores que corroboram com a contaminação de seres humanos e ambientes, dentre eles: gênero, idade, sítio de colonização, hábitos, objetos e perfil socioeconômico (ABDULGADER et al., 2019; NG et al., 2016).

Os índices de colonização de *S.aureus* são elevados na infância. Nas primeiras oito semanas de vida, a taxa de colonização varia de 40% a 50%, e 21% aos 6 meses de idade (SAKR et al., 2018). Davoodabadi et al. (2016) encontraram uma prevalência de 60% de MRSA aos 6 anos de idade; outro estudo relacionou o aumento proporcional de transmissão com aumento do número de crianças no domicílio (KNOX et al., 2015). Esses estudos demonstram que crianças estão submetidas a um risco significativo de colonização por MSSA e MRSA.

A exposição a *S. aureus* (HA-MRSA e CA-MRSA), principalmente o CA-MRSA, podem ser adquiridos através do contato com os mais variados tipos de objetos encontrados no ambiente, dentre eles: roupas de cama, toalha de banho, cadeira, carpete, caneta, loções e equipamentos esportivos (NG et al., 2016). Além disso, grupos com contato físico de alta intensidade são especialmente afetados, incluindo-se atletas de competição, crianças em creches, militares, usuários de drogas e presidiários (DAVOODABADI et al., 2016).

A presença de colonização por MRSA também foi associada à crianças com tabagismo passivo, e à utilização de antióticos nos últimos doze meses. Além disso, foi associado à colonização nasal isolados de MRSA com presença do gene *PVL* entre crianças saudáveis (CHEN et al., 2018).

Outros relevantes fatores de riscos à colonização por MRSA são: admissão hospitalar prévia, obesidade, abscessos, transporte vaginal de mães para crianças durante o parto, cirurgias e viagens internacionais recentes (KNOX et al., 2015; LIN; YAO, 2018; NARAYANAN et al., 2019).

S.aureus estão entre os maiores produtores de infecções humanas, e seus mecanismos de virulência podem causar infecções graves como pneumonia, meningite, endocardite, sepse, entre outras (SANTOS et al., 2007). O transporte nasal é considerado um fator de risco de infecção para pacientes submetidos a diálise, incisão cirúrgica e tempo de internação prolongado. Além disso, é a causa mais comum de infecção do sítio cirúrgico em cirurgias ortopédica e cardíacas (TRAUTMANN et al., 2007).

Condições clínicas e sociais do hospedeiro são determinantes para desenvolvimento de infecções por MSSA, HA-MRSA e CA-MRSA, respectivamente. Segundo Thomas et al. (2017), pessoas de nível social mais baixo estão mais propensas a desenvolverem essas infecções. Já para Septimus e Schweizer (2016), pacientes imunocomprometidos estão expostos às infecções mais graves.

Conhecer os fatores de riscos da colonização e infecção dos isolados de *S. aureus* é condição primordial no controle das infecções, e é de grande importância na redução do impacto econômico nos sistemas de saúde.

1.5 TRATAMENTO

Dentre as opções de tratamento de infecções por *S. aureus*, o uso de antimicrobianos é a opção terapêutica de primeira escolha. No entanto, há uma relativa escassez de ensaios controlados randomizados de alta qualidade para guiar todas as indicações de tratamento de forma correta, exceto para as infecções bacterianas agudas de pele que estão bem descritas na literatura (TURNER et al., 2019).

A vancomicina, um antimicrobiano glicopeptídico (inibidor da síntese da parede celular bacteriana que através da incorporação no peptidoglicano das subunidades N-ácido acetilmuramico e N-acetilglucosamina liga-se reversivelmente a estas moléculas), tem sido usado por mais de 50 anos e continua a ser o padrão de atendimento para tratamento das infecções graves por MRSA (LIU et al., 2011).

Outro fármaco relativamente novo utilizado para o tratamento de infecções estafilocócicas é a daptomicina. Esta, é um antimicrobiano lipopeptídeo cíclico aprovado para o tratamento de infecções complexas da estrutura da pele, bacteremias, endocardites causadas por bactérias Gram-positivas. A daptomicina exerce seus efeitos bactericidas através de vários mecanismos, incluindo a inserção e rompimento da membrana plasmática bacteriana, inibição proteica e da síntese de DNA, RNA e ácido lipoteicoico (HANCOCK, 2005). É importante ressaltar que, como a daptomicina é inativada pelo surfactante pulmonar, ela não deve ser usada no tratamento de pneumonia por MRSA (PALMQVIST et al., 2005).

A clindamicina, disponível pela primeira vez no final do ano de 1960, é um agente bacteriostático da classe das lincosamidas, e trabalha bloqueando a síntese de proteínas bacterianas, inibindo a reação de peptidiltransferase na subunidade 50S do ribossomo bacteriano. É indicada no tratamento de infecções por MRSA, por exemplo, osteomielite, infecções de partes moles e pneumonia (BOUAZZA et al., 2012; LIU et al., 2011).

Assim como a clindamicina, a linezolida, da classe das oxazolidinonas, é um antimicrobiano conhecido por sua eficácia no tratamento de pneumonias por MRSA. Seu mecanismo de ação ocorre através da ligação da subunidade ribossomal bacteriana 50S (MORATA et al., 2013).

Em se tratando de infecções comunitárias por MSSA (pneumonia, pele e partes moles), a ceftarolina (cefalosporina de geração avançada), apresenta resultados satisfatórios na prática médica. O seu mecanismo de ação é bactericida,

e isso acontece pela ligação das *PBPs* e inibição da síntese da parede celular (NARAYANAN et al., 2019).

E por fim, sulfametoxazol (SMX)/Trimetoprima (TMP), uma combinação antimicrobiana de amplo espectro, vem sendo utilizada no cenário ambulatorial há mais de 50 anos, tanto em adultos como em crianças. A TMP inibe a competitividade de produção de diidrofolato redutase, e a SMX interfere na produção de diidrofolato. Essa combinação sinérgica é bactericida, levando a morte do microrganismo (NARAYANAN et al., 2019).

Outras apresentações farmacológicas estão disponíveis no mercado para o tratamento das infecções por *S. aureus*, sendo importante conhecê-las afim de ampliar as possibilidades terapêuticas no âmbito hospitalar e ambulatorial.

Na expectativa de novos tratamentos, terapias alternativas antiestafilocócicas vem sendo testadas. Compostos isolados de chá verde, galato de epicatiaquina e galato de epigalocatequina, exibiram a capacidade de reduzir a resistência a β -lactâmicos em *S. aureus* (Hamilton-Miller e Shah, 2000; Stapleton et al., 2006). Outra substância chamada Totarol da classe dos Diterpenos, tem demonstrado potencializar a atividade da metilina contra MRSA (Nicholson et al., 1999) e capacidade de inibição à atividade da bomba de efluxo de múltiplos fármacos em *S. aureus* (SMITH et al., 2007).

A imunização anti-MRSA também foi testada na expectativa de uma inovação terapêutica, mas nesse sentido, os resultados dos ensaios clínicos até o momento não obtiveram sucesso. Por exemplo, a *StaphVAX*, uma vacina conjugada bivalente que ataca os polissacarídeos capsulares tipo 5 e 8, não foi capaz de conferir imunidade duradoura (SHINEFIELD et al., 2002). A *V710*, uma vacina monovalente que tem como alvo a proteína de salvamento de ferro *IsdB*, estava na verdade associada a um aumento da mortalidade, resultando na interrupção precoce do estudo (GIERSING et al., 2016). E recentemente a empresa americana Pfizer® anunciou em dezembro de 2018 que o ensaio da fase IIb de sua vacina multi- antígeno (PF-06290210) foi descontinuada por futilidade (TURNER et al., 2019).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

Aproximadamente 30% da população mundial abriga *S. aureus*, sendo as narinas anteriores o principal local de colonização. O transporte nasal está

associado a um risco aumentado de desenvolver infecções estafilocócicas subsequentes (ANTRI et al., 2018).

MRSA são responsáveis por 25 a 50% das infecções de *S. aureus* em hospitais (WANG et al., 2018). No entanto, a epidemiologia de MRSA está mudando em todo o mundo, e esse advento se dá pelo aumento dos isolados CA-MRSA que variam substancialmente nos fatores idade, geografia e doença de base. Além disso, a incidência de infecções por CA-MRSA é maior em crianças (CHEN; HUANG, 2014).

Surtos globais foram relatados nos Estados Unidos (EUA) e na Nova Zelândia. Em um estudo de vigilância de base populacional de três comunidades dos EUA em 2001 e 2002, 8 a 20% de todos os isolados de MRSA foram CA-MRSA por definição, com maior incidência entre crianças menores de 2 anos de idade. As maiores taxas de colonização por CA-MRSA são relatadas na América do Norte e do Sul, Ásia e Malta (50%). Taxas intermediárias são relatadas na China, Austrália, África e alguns países europeus, como Portugal (49%), Grécia (40%), Itália (37%) e Romênia (34%). Outros países europeus, incluindo os Países Baixos e Escandinavos, apresentam taxas de prevalência geralmente baixas (ALAKLOBI et al., 2015; SOLTANI et al., 2014).

Uma meta-análise (152 estudos transversais e caso-controle) realizado na região Ásia-Pacífico entre 2000 a 2016, sendo a população a maioria crianças com idade igual ou menor de 6 anos, identificou CA-MRSA em 25% e HA-MRSA em 56%. Além disso, foi analisada a prevalência de colonização de CA-MRSA entre os subgrupos, dentre eles, membros do agregado familiar (13,0%-26,4%), mães de crianças de 2 anos (8,0%) e pediatras (8,5%). Também vale ressaltar que no presente estudo as maiores estimativas foram observadas quando as coletas de *swab* foram realizadas em várias regiões do corpo (WONG et al., 2018).

Na América do Sul os primeiros relatos de CA-MRSA apareceram em 2003 e 2004. Na Argentina, pesquisadores identificaram o aumento de três vezes o número de infecções causadas por CA-MRSA na população pediátrica entre os anos de 2004-2014 (ENSINCK et al., 2018). Na Colômbia, um estudo realizado em pacientes pediátricos do Hospital Universitário de Santander em Bucaramanga identificou 42% de taxas de infecções causadas por MRSA. No total, 8% das crianças tinha menos de 1 mês de idade, 40% de 1 a 24 meses, 35% de 2 a 10 anos e 17% maiores que 10 anos (MACHUCA; GONZÁLEZ; SOSA, 2014). No Uruguai, o fenótipo CA-MRSA

foi identificado em 73% dos isolados de pacientes com doenças invasivas (osteointerarticular, pneumonia e bacteremia) (PARDO et al., 2013).

No Brasil, o CA-MRSA é um patógeno emergente, sendo responsável por aproximadamente um terço de todos os isolados de *S. aureus* de crianças com infecções graves adquiridas na comunidade. Em um estudo realizado na Unidade de Emergência de um Hospital Universitário terciário de 121 leitos na cidade de Ribeirão Preto, foram analisadas as taxas de densidade de incidência por 1000 pacientes pediátricos, dos quais CA-MRSA e HA-MRSA apresentaram tendência crescente e MSSA mostrou tendência oposta (PATERNINA-DE LA OSSA et al., 2018). Já Arias et al. (2017) reportaram 62% de taxas de infecções por MRSA no Brasil.

As infecções por CA-MRSA têm sido pouco relatadas no Brasil, com isso, há pouco conhecimento sobre a epidemiologia nacional desse patógeno (DA SILVEIRA et al., 2018; PIRES et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A colonização por *S. aureus* aumenta o risco para o desenvolvimento de infecções entre crianças, bem como crianças colonizadas são reservatórios para disseminação desse agente. Não há estudos de colonização por *S. aureus* em crianças da comunidade na região norte do Paraná. Portanto, é importante conhecer a prevalência de colonização por *S. aureus* e CA-MRSA em crianças da comunidade de Londrina e região.

Os resultados do presente estudo podem demonstrar fatores associados a colonização por *S. aureus* e a relação de colonização entre mãe e criança pelo mesmo microrganismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência de colonização por *S. aureus* em crianças e suas mães admitidas no pronto socorro pediátrico de um hospital universitário.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a prevalência de colonização por *S. aureus* em crianças admitidas em pronto-socorro, bem como de suas mães;
- b) Identificar a sensibilidade aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados de crianças e suas mães;
- c) Identificar os mecanismos de resistência de *S. aureus* à oxacilina;
- d) Realizar a determinação da tipagem do gene *mecA* em isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina;
- e) Determinar os fatores de virulência de *S. aureus*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O Hospital Universitário de Londrina é um órgão suplementar da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL), entidade sem fins lucrativos, que se dedica ao ensino, pesquisa e extensão de serviços à comunidade, pela prestação de atendimento universal. É um hospital terciário, centro de referência para o SUS na região norte do estado do Paraná, Brasil. Atende pacientes de cerca de 250 municípios do Paraná e de mais de 100 cidades de outros estados. Possui 508 leitos distribuídos entre unidades de internação, pronto socorro e unidade de terapia intensiva (UTI).

Os testes laboratoriais descritos nesse trabalho foram realizados no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do HU-UEL e no laboratório de biologia molecular de microrganismos localizado no Centro de Ciências Biológicas (CCB) no campus da UEL.

4.2 DELINEAMENTO

Estudo transversal, de prevalência, não controlado, realizado no pronto-socorro pediátrico da instituição do estudo. Foram incluídas 200 crianças e suas respectivas mães, admitidas no pronto-socorro entre maio de 2018 e abril de 2019. Foi realizado um estudo caso-controle entre crianças colonizadas e não colonizadas por *S. aureus*, para analisar as seguintes variáveis: idade, colonização materna por *S. aureus*, internação nos últimos 6 meses, presença de doença crônica, uso de antibiótico prévio e familiar que trabalha em hospital. As crianças colonizadas por *S. aureus* foram encaminhadas ao ambulatório de Infectologia Pediátrica do Ambulatório de Especialidades do HU para seguimento.

4.3 CÁLCULO DA AMOSTRA

Considerando uma prevalência estimada de 40% de crianças colonizadas por *Staphylococcus aureus* (BRAGA et al., 2014) e 1.000 crianças atendidas por ano do Pronto Socorro Pediátrico em um ano, com intervalo de confiança de 90% e erro

aceitável de 5%, o tamanho estimado da amostra foi de 207 crianças (Epi Info™ DHIS, CDC, versão 5.2.1).

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas crianças entre 1 mês e 12 anos de idade, admitidas no Pronto Socorro Pediátrico do Hospital Universitário de Londrina (HUL) com tempo de hospitalização menor que 48 horas.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os seguintes pacientes: recém-nascidos; crianças internadas mais que 5 dias nos últimos 6 meses; crianças com história de admissão prévia durante no mínimo 48 horas em UTI, nos últimos 6 meses.

4.6 MÉTODOS FENOTÍPICOS

4.6.1 Coleta das Amostras

Para investigar a presença de *S. aureus* foram coletadas amostras (oral, nasal, axilar e inguinal) da mãe e criança utilizando-se hastes de algodão flexíveis (*swab*). As amostras foram obtidas girando-se o *swab*, delicadamente, nas fossas nasais. Os mesmos foram transportados ao laboratório de microbiologia em meio de transporte Stuart, imediatamente ou no prazo máximo de 2 horas.

Juntamente com a coleta da amostra, foram anotados os dados do indivíduo para cálculos de prevalência. Para tal, utilizou-se um instrumento de coleta de dados (Apêndice C).

4.6.2 Isolamento e Identificação Fenotípica de *Staphylococcus aureus*

As amostras biológicas contidas nos *swabs* foram inoculadas em caldo de soja e tripticaseína (*Tryptone Soya Broth* – TSB) contendo 6,5% de cloreto de sódio (NaCl), sendo incubado em estufa microbiológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período, com auxílio de uma alça bacteriológica, foi retirada uma alíquota de 10 μL

do caldo TSB que apresentou turvação e inoculada em *Mannitol Salt Ágar* (MSA) (Oxoid, Basingstoke, England), a placa foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. As colônias amarelas que se desenvolveram no MSA foram identificadas utilizando-se metodologia manual de acordo com Jorgensen et al. (2015). Após a confirmação de que a amostra realmente continha *S. aureus*, procedeu-se a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos e demais testes, na sequência as bactérias foram armazenadas a -80°C em meio TSB contendo 30% de glicerol.

4.6.3 Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado por disco-difusão de acordo com metodologia padronizada pelo *Clinical Laboratory Standards International* (CLSI, 2017), de modo que as colônias corretamente identificadas como *S. aureus* foram suspensas em salina 0,9%, ajustando a suspensão em espectrofotômetro (DensiCHEK Plus, BioMérieux®) na escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) a qual foi aplicada em Mueller Hinton Ágar (MHA) com um *swab* estéril e os discos foram dispostos sob o ágar com auxílio de uma pinça flambada.

Utilizaram-se os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, England): penicilina (10U); cefoxitina (30 μg); eritromicina (15 μg); clindamicina (2 μg); gentamicina (10 μg); tetraciclina (30 μg); linezolida (30 μg); ciprofloxacino (5 μg); rifampicina (5 μg); cloranfenicol (30 μg) e sulfametoxazol + trimetoprima (23,75/1,25 μg). Além destes, também foi testado o disco de tigeciclina (15 μg), conforme metodologia determinada pelo *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2017).

4.6.4 Avaliação da Sensibilidade à Oxacilina em Meio Suplementado

Para fornecer resultados complementares aos do TSA, foram aplicados discos de oxacilina (1 μg) (Oxoid, Basingstoke, England) em MHA suplementado com 2% de NaCl. Foi utilizada a mesma suspensão bacteriana e técnica de execução empregadas no TSA. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, efetuando as leituras em 24 e 48 horas. O halo de inibição foi anotado em milímetros (nenhum halo de inibição foi anotado como 0 mm). O isolado foi classificado como resistente à

oxacilina quando o halo de inibição ≤ 10 mm de diâmetro, intermediário quando halo de inibição entre 11 e 12mm e sensível quando ≥ 13 mm (CLSI, 2012a, 2012b).

4.6.5 Triagem para Identificação de Resistência a Oxacilina em Ágar Diluição

Para esta triagem foi utilizada a técnica de Ágar *screening* em *Brain Heart Infusion* Ágar (BHIA) contendo 6 μ g/mL de oxacilina. A partir da suspensão de *S. aureus* previamente preparada para o TSA, com uma alça calibrada estéril e descartável, retirou-se uma alíquota de 10 μ L, a qual foi disposta sob uma placa contendo o ágar suplementado e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. As leituras foram feitas em 24 e 48 horas (CLSI, 2016).

4.6.6 Triagem para Identificação de Isolados hVISA

Visando a detecção de hVISA, foi utilizada novamente a técnica de Ágar *screening* em BHIA, porém este suplementado com vancomicina, utilizando-se biplacas, contendo em um lado 3 μ g/mL e no outro 4 μ g/mL de vancomicina. A partir da suspensão de *S. aureus* previamente preparada para o TSA, com uma alça calibrada estéril e descartável, retirou-se uma alíquota de 10 μ L, a qual foi disposta sob uma placa contendo o ágar suplementado e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. As leituras foram feitas em 24 e 48 horas. O resultado foi considerado positivo quando ocorreu o crescimento de duas ou mais colônias após 24 horas. Como controles positivos foram utilizadas as cepas de *S. aureus* Mu3 ATCC[®] 700698 (h- VISA), Mu50 ATCC[®] 700699 (VISA), *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 51299 (VRE) e como negativo, *S. aureus* ATCC[®] 29213 (KHATIB et al., 2015).

4.6.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Oxacilina

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina foram utilizadas fitas de E-test[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia) impregnadas com oxacilina em concentrações seriadas de 0,016 a 256 μ g, de acordo com orientações do fabricante.

4.6.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Vancomicina

Para determinação da sensibilidade e CIM de vancomicina foram utilizadas fitas de E-test® (AB Biodisk, Solna, Suécia) impregnadas com vancomicina em concentrações seriadas de 0,016 a 256 µg, de acordo com orientações do fabricante.

4.6.9 Reativação dos Isolados

Para realização das análises moleculares, as bactérias previamente estocadas necessitam ser inoculadas em meio TSB para sua reativação. Para tal, utilizou-se uma alíquota do estoque, a qual foi inoculada em 3mL do referido caldo e incubada *overnight*. Na sequência foi realizada a extração do DNA bacteriano.

4.7 MÉTODOS GENOTÍPICOS

4.7.1 Extração de DNA

A extração do DNA total foi realizada conforme descrito por Ausubel et al. (1999).

4.7.2 PCR Convencional

Como teste confirmatório para a identificação da espécie foi utilizado gene codificante da coagulase (gene *coa*) de acordo com Tiwari, Sapkota e Sen (2008). A detecção dos genes de virulência: Leucocidina de Panton-Valentine (*lukS-PV-lukF-PV*); toxina da síndrome do choque tóxico-1 (*tst*) e biofilme (*icaA*) foram realizadas como descrito por Campbell et al. (2008). A avaliação da resistência, para os fármacos β-lactâmicos, foi avaliada de acordo com a presença do gene *mecA*. Além da presença deste gene, os elementos SCC*mec* foram tipificados de acordo com metodologia proposta por Milheiriço, Oliveira e Lencastre (2007), assim como *mecA*.

4.7.3 Genotipagem

A diversidade genética de todos os isolados *mecA* positivos foi analisada por PCR baseada em sequência de elementos repetitivos (REP-PCR) usando o primer RW3A como descrito por (DEL VECCHIO et al., 1995).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados em banco de dados do Programa Microsoft Office Excell® 2010 e a análise estatística foi realizada com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS® – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows. Foram calculadas mediana e intervalos interquartis das variáveis contínuas. Variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL) sob o número CAAE: 86708018.4.0000.5231, obtendo o parecer de número: 2.620.864 (Anexo)

Os indivíduos foram esclarecidos sobre a pesquisa e convidados a participar mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que pode ser visualizado no Apêndice A e B).

Após esclarecimento dos objetivos e métodos do estudo e o consentimento do participante, foi realizada a coleta da amostra.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados e discutidos em dois artigos descritos a seguir.

Artigo 1 – Colonização por *Staphylococcus aureus* em crianças da comunidade, no Paraná.

Artigo 2 – Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA) de crianças atendidas em um hospital do sul do Brasil.

5.1 ARTIGO 1 – COLONIZAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM CRIANÇAS DA COMUNIDADE, NO PARANÁ

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado a comunidade (CA- MRSA) é uma ameaça global emergente por causar infecções invasivas potencialmente fatais. O objetivo desse estudo foi avaliar a colonização por CA- MRSA em crianças e suas respectivas mães atendidas no pronto-socorro de um Hospital Universitário. Foram incluídas 200 crianças hospitalizadas por período menor de 48 horas no momento da coleta dos swabs, sem história de internação recente, entre maio de 2018 e abril de 2019. Foram coletadas amostras de swab oral, nasal, axilar e inguinal da mãe e criança. Após o isolamento do *S. aureus* foram realizados os testes fenotípicos, com avaliação da sensibilidade à oxacilina e aos demais antimicrobianos. Em 32,5% das crianças foi detectada a presença de *S. aureus*, sendo 35,4% MRSA. Em 43 mães foi detectada a presença de *S. aureus* (21,5%), 17 amostras eram MRSA (39,5%). Em relação à colonização dos binômios mãe-criança, 46,5% destes estavam colonizadas *S. aureus* (OR: 2,164 [IC 95% 1,083-4,323], $p = 0,027$). As crianças com idade maior ou igual a seis anos apresentaram maior índice de colonização por *S. aureus* (44,6%) em relação as crianças menores de seis anos (OR: 0,423 [IC 95% 0,230-0,778], $p = 0,005$), porém as crianças menores de 6 anos apresentaram maior frequência (65,2%) de MRSA. Entre as crianças colonizadas por MRSA, 74% apresentaram resistência a clindamicina e 34,7% resistência a sulfametoxazol-trimetoprima. Foi detectada elevada colonização por CA-MRSA entre crianças e suas mães. O perfil de sensibilidade destas cepas comunitárias é preocupante, pelo risco de disseminação e dificuldade de tratamento.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Mãe, Criança, *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina.

INTRODUÇÃO

O principal local de colonização do *S. aureus* é o vestíbulo nasal (ou narinas anteriores) e na população geral a prevalência de colonização é de aproximadamente 20 a 30% (CHEN et al., 2017; DEN HEIJER et al., 2013; GORWITZ et al., 2008; SAADATIAN-ELAHI et al., 2013). Na maioria dos casos o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) a origem é hospitalar (HA-MRSA), responsável por 25 a 50% das infecções por *S. aureus* em hospitais (WANG et al., 2018). Porém, o *S. aureus* resistente à meticilina associado a comunidade (CA-MRSA) é uma ameaça global emergente em saúde pública por causar infecções invasivas leves e potencialmente fatais como a pneumonia necrotizante (WONG et al., 2018). O CA-MRSA é definido clinicamente como o MRSA isolado de pacientes ambulatoriais ou coletado nas 48 horas iniciais de hospitalização (MOBASHERIZADEH et al., 2019). A epidemiologia do MRSA está mudando em todo o mundo e esse advento se dá pelo aumento das cepas CA-MRSA, que variam substancialmente conforme a localização, faixa etária e presença de doença de base. Além disso, a incidência de infecções por CA-MRSA é maior em crianças (CHEN; HUANG, 2014). No Brasil, a poucas disseminações científicas acerca das infecções e colonizações por CA-MRSA, e pouco é conhecido sobre a epidemiologia nacional desse patógeno em crianças (PATERNINA-DE LA OSSA et al., 2018). O objetivo desse estudo foi avaliar a colonização por CA-MRSA em crianças e suas respectivas mães atendidas no pronto-socorro de um hospital universitário.

MATERIAIS E MÉTODOS

Locais de Realização do Estudo

O Hospital Universitário é um órgão suplementar da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL), entidade sem fins lucrativos, que se dedica ao ensino, pesquisa e extensão de serviços à comunidade, pela prestação de atendimento universal. É um hospital terciário, centro de referência para o SUS na região norte do estado do Paraná, Brasil. Atende pacientes de cerca de 250 municípios do Paraná e de mais de 100 cidades de outros estados. Possui 508 leitos distribuídos entre unidades de internação, pronto socorro e unidade de terapia intensiva.

Os testes descritos nesse trabalho foram realizados no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do HU-UEL e no laboratório de biologia molecular de microrganismos localizado no Centro de Ciências Biológicas no campus da UEL.

O Pronto Socorro Pediátrico do HU-UEL é referência no atendimento de crianças em situação de urgência e emergência. Durante o período do estudo 8.386 crianças foram atendidas neste serviço, das quais 4.193 foram submetidas à atendimento seguido de alta, 2.930 atendimentos seguidos de período de observação durante menos de 24 horas e 1.563 internações.

Delineamento

Estudo transversal, de prevalência, não controlado, realizado no pronto-socorro pediátrico de um hospital universitário de Londrina, no Paraná. Foram incluídas 200 crianças e 200 mães admitidas no pronto-socorro entre maio de 2018 e abril de 2019. Foi realizado um estudo caso-controle entre crianças colonizadas e não colonizadas por *S. aureus*, para analisar os seguintes fatores: idade, colonização materna por *S. aureus*, internação nos últimos 6 meses, presença de doença crônica, uso de antibiótico prévio e familiar que trabalha em hospitalar.

Cálculo da Amostra

Considerando uma prevalência estimada de 40% de crianças colonizadas por *S. aureus* (BRAGA, 2014) e 1.000 crianças atendidas por ano no Pronto Socorro Pediátrico do HU-UEL em um ano, com intervalo de confiança de 90% e erro aceitável de 5%, o tamanho estimado da amostra foi de 197 crianças (Epi Info™ DHIS, CDC, versão 5.2.1).

Critérios de Inclusão

Foram incluídas crianças entre 1 mês e 12 anos de idade, admitidas no Pronto Socorro Pediátrico do Hospital Universitário de Londrina (HUL) nas primeiras 48 horas de hospitalização.

Crêterios de Exclusão

Foram excluídos os seguintes pacientes: recém-nascidos; crianças internadas por mais que 5 dias nos últimos 6 meses; crianças com história de admissão prévia em UTI, por pelo menos 48 horas, nos últimos 6 meses.

Coleta das Amostras

Para investigar a presença de *S. aureus* foram coletadas amostras (oral, nasal, axilar e inguinal) da mãe e criança utilizando-se hastes de algodão flexíveis (*swab*). As amostras das mães e das crianças foram obtidas rotacionando o *swab*, delicadamente, em orofaringe, nas fossas nasais, em axilas e virilhas. Os mesmos foram transportados ao laboratório de microbiologia em meio de transporte Stuart, imediatamente ou no prazo máximo de 2 horas.

Juntamente com a coleta da amostra, foram anotados os dados dos pacientes em instrumento de coleta de dados.

Isolamento e Identifica o Fenotípica de *S. aureus*

As amostras biológicas contidas nos *swabs* foram inoculadas em caldo de soja e tripticaseina (*Tryptone Soya Broth* – TSB) contendo 6,5% de cloreto de sódio (NaCl), sendo incubado em estufa microbiológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período, com auxílio de uma alça bacteriológica, foi retirada uma alíquota de 10 L do caldo TSB que apresentou turva o e inoculada em *Mannitol Salt  gar* (MSA) (Oxoid, Basingstoke, England), a placa foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. As colônias amarelas que se desenvolveram no MSA foram identificadas utilizando-se metodologia manual de acordo com Jorgensen et al. (2015). Após a confirma o de que a amostra realmente continha *S. aureus*, procedeu-se a avalia o da sensibilidade aos antimicrobianos e demais testes, na sequência as bactérias foram armazenadas a -80°C em meio TSB contendo 30% de glicerol.

Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado por disco-difusão de acordo com metodologia padronizada pelo *Clinical Laboratory Standards International* (CLSI, 2017), de modo que as colônias corretamente identificadas como *S. aureus* foram suspensas em salina 0,9%, ajustando a suspensão em espectrofotômetro (DensiCHEK Plus, BioMérieux®) na escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) a qual foi aplicada em Mueller Hinton Ágar (MHA) com um swab estéril e os discos foram dispostos sob o ágar com auxílio de uma pinça flambada.

Utilizaram-se os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, England): penicilina (10U); cefoxitina (30 μ g); eritromicina (15 μ g); clindamicina (2 μ g); gentamicina (10 μ g); tetraciclina (30 μ g); linezolid (30 μ g); ciprofloxacino (5 μ g); rifampicina (5 μ g); cloranfenicol (30 μ g) e sulfametoxazol + trimetoprima (23,75/1,25 μ g). Além destes, também foi testado o disco de tigeciclina (15 μ g), conforme metodologia determinada pelo *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2017).

Avaliação da Sensibilidade à Oxacilina em Meio Suplementado

Para fornecer resultados complementares aos do TSA, foram aplicados discos de oxacilina (1 μ g) (Oxoid, Basingstoke, England) em MHA suplementado com 2% de NaCl. Foi utilizada a mesma suspensão bacteriana e técnica de execução empregadas no TSA. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, efetuando as leituras em 24 e 48 horas. O halo de inibição foi anotado em milímetros (nenhum halo de inibição foi anotado como 0 mm). O isolado foi classificado como resistente à oxacilina quando o halo de inibição ≤ 10 mm de diâmetro, intermediário quando halo de inibição entre 11 e 12mm e sensível quando ≥ 13 mm (CLSI, 2012a, 2012b).

Triagem para Identificação de Resistência a Oxacilina em Ágar Diluição

Para esta triagem foi utilizada a técnica de Ágar *screening* em *Brain Heart Infusion* Ágar (BHIA) contendo 6 μ g/mL de oxacilina. A partir da suspensão de *S. aureus* previamente preparada para o TSA, com uma alça calibrada estéril e descartável, retirou-se uma alíquota de 10 μ L, a qual foi disposta sob uma placa

contendo o ágar suplementado e incubada a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As leituras foram feitas em 24 e 48 horas (CLSI, 2016).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Oxacilina

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina foram utilizadas fitas de E-test® (AB Biodisk, Solna, Suécia) impregnadas com oxacilina em concentrações seriadas de 0,016 a 256 µg, de acordo com orientações do fabricante.

Triagem para Identificação de Isolados hVISA

Visando a detecção de isolados hVISA, foi utilizada novamente a técnica de Ágar *screening* em BHIA, porém este suplementado com vancomicina, utilizando-se biplacas, contendo em um lado 3µg/mL e no outro 4µg/mL de vancomicina. A partir da suspensão de *S. aureus* previamente preparada para o TSA, com uma alça calibrada estéril e descartável, retirou-se uma alíquota de 10µL, a qual foi disposta sob uma placa contendo o ágar suplementado e incubada a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As leituras foram feitas em 24 e 48 horas. O resultado foi considerado positivo quando ocorreu o crescimento de duas ou mais colônias após 24 horas. Como controles positivos foram utilizadas as cepas de *S. aureus* Mu3 ATCC® 700698 (h- VISA), Mu50 ATCC® 700699 (VISA), *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299 (VRE) e como negativo, *S. aureus* ATCC® 29213 (KHATIB et al., 2015).

Determinação da concentração inibitória mínima para vancomicina

Para determinação da sensibilidade e CIM de vancomicina foram utilizadas fitas de E-test® (AB Biodisk, Solna, Suécia) impregnadas com vancomicina em concentrações seriadas de 0,016 a 256 µg, de acordo com orientações do fabricante

Análise Estatística

Os dados foram compilados em banco de dados do Programa Microsoft Office Excell® 2010 e a análise estatística foi realizada com o software *Statistical Package*

for the Social Sciences (SPSS® – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows. Foram calculadas mediana e intervalos interquartis das variáveis contínuas. Variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, e intervalo de confiança de 95%.

Bioética

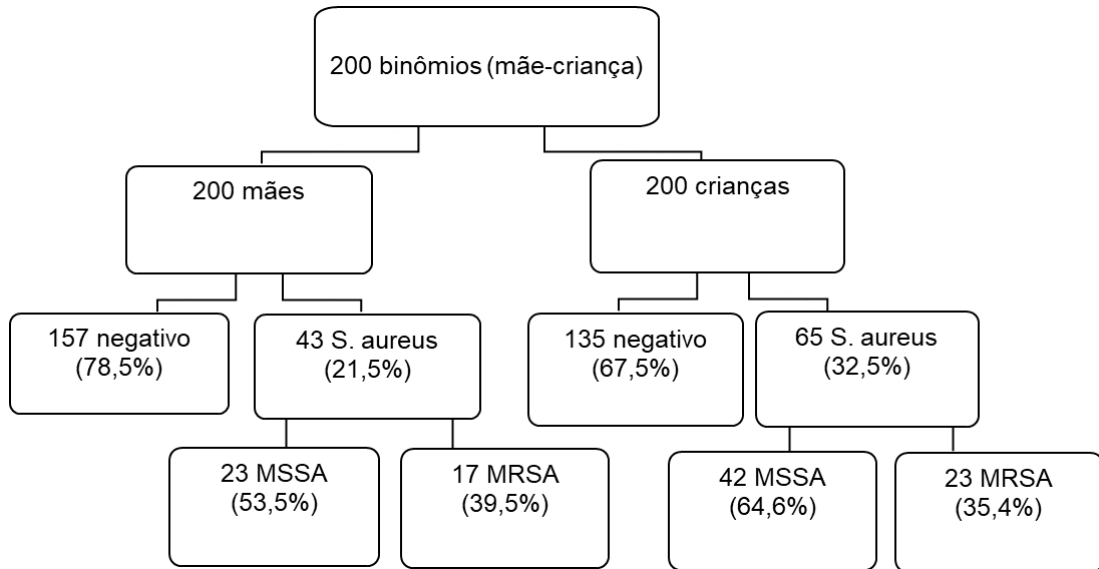
O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL) sob o número CAAE: 86708018.4.0000.5231, com o número do parecer: 2.620.864

Os indivíduos foram esclarecidos sobre a pesquisa e convidados a participar mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

RESULTADOS

Foram coletadas 200 amostras de swabs de crianças e suas respectivas mães. A frequência de isolamento de *S. aureus* foi maior em crianças, que em mães. Em 32,5% das crianças foi detectada a presença de *S. aureus*, sendo 35,4% MRSA (Figura 1). A mediana de idade das mães foi de 30 anos (25 anos no percentil 25 e 36 anos no percentil 75) e das crianças 48 meses (36 meses no percentil 25 e 84 meses no percentil 75).

Figura 1 – Distribuição de mães e crianças colonizadas ou não por *Staphylococcus aureus* (n=400)



Do total de binômios mãe-criança investigados, 46,5% estavam ambos colonizados por *S. aureus*. Destes 60% estavam colonizados por MRSA. As crianças com idade maior ou igual a seis anos apresentaram maior frequência de colonização por *S. aureus* em relação as crianças menores de seis anos. As crianças do sexo feminino apresentaram índices maiores de colonização por *S. aureus* e MRSA (Tabela 1).

Tabela 1 – Associação das variáveis clínico-demográficas e colonização materna com crianças colonizadas e não colonizadas por *Staphylococcus aureus* (n=200) Londrina, PR, Brasil, 2019

Variáveis	Criança colonizada por <i>S. aureus</i>		Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
	Sim n %	Não n %		
Mãe colonizada para <i>S. aureus</i>				
Sim	20 (46,5)	23 (53,5)	2,164 (1,083-4,323)	0,027
Não	45 (28,7)	112 (71,3)		
Hospitalização prévia*				
Sim	8 (38,1)	13 (61,9)	1,317 (0,517-3,356)	0,563
Não	57 (31,8)	112 (68,2)		
Doença crônica				
Sim	21 (42,9)	28 (57,1)	1,824 (0,937-3,549)	0,075
Não	44 (29,1)	107 (70,9)		
Familiar trabalhador da saúde				
Sim	6 (35,3)	11 (64,7)	1,146 (0,404-3,250)	0,797
Não	59 (32,2)	124 (67,8)		
Uso prévio de antimicrobianos**				
Sim	8 (38,1)	13 (61,9)	1,317 (0,517-3,356)	0,563
Não	57 (31,8)	122 (68,2)		
Idade das crianças				
< 6 anos	32 (25,4)	94 (74,6)	0,423 (0,230-0,778)	0,005
≥ 6 anos	33 (44,6)	41 (55,4)		
Sexo				
Feminino	40 (61,5)	69 (51,1)	1,530 (0,837-2,797)	0,165
Masculino	25(38,5)	66 (48,9)		

*Criança internada até 5 dias nos últimos 6 meses. **Uso de antimicrobianos nos últimos 6 meses. Os dados categóricos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado.

Não houve associação significativa entre crianças positivas para *S. aureus* e as variáveis: histórico de doença crônica, uso de antibiótico nos últimos seis meses e familiar que trabalha em hospital (Tabela 1).

Observou-se taxas mais elevadas de colonização de MRSA nas crianças menores de seis anos (65,2%) quando comparadas aos maiores de seis anos (34,8%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Associação das variáveis clínico-demográficas em relação a colonização de crianças por *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à oxacilina, Londrina, PR, Brasil, 2019

Variáveis	Colonização da criança		Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
	MSSA n %	MRSA n %		
Mãe colonizada para <i>S. aureus</i>				
Sim	13 (31,0)	7 (30,4)	1,025 (0,340-3,088)	0,966
Não	29 (69,0)	16 (69,6)		
Hospitalização prévia*				
Sim	4 (9,5)	4 (17,4)	0,500 (0,113-2,221)	0,439
Não	38 (90,5)	19 (82,6)		
Doença crônica				
Sim	13 (31,0)	8 (34,8)	0,841 (0,286-2,473)	0,752
Não	29 (69,0)	15 (65,2)		
Familiar trabalhador da saúde				
Sim	4 (9,5)	2 (8,7)	1,105 (0,187-6,548)	1,000
Não	38 (90,5)	31 (91,3)		
Uso prévio de antimicrobianos**				
Sim	7 (16,7)	6 (26,1)	0,567 (0,165-1,948)	0,364
Não	35 (83,3)	17 (73,9)		
Idade das crianças				
<6 anos	17 (40,5)	15 (65,2)	0,363 (0,126-1,043)	0,056
≥6 anos	25 (59,5)	8 (34,8)		
Sexo				
Feminino	26 (61,9)	14(60,9)	1,045 (0,368-2,966)	0,935
Masculino	16 (38,1)	9 (39,1)		

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à metilina. *Criança internada até 5 dias nos últimos 6 meses. **Uso de antimicrobianos nos últimos 6 meses. Os dados categóricos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado.

As mães mais jovens, que internaram ou usaram antibiótico nos últimos 6 meses e com familiares trabalhadores da área da saúde não apresentaram maior chance de colonização por *S. aureus*, que as mães não colonizadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Associação das variáveis clínico-demográficas e colonização materna por *Staphylococcus aureus*, Londrina, PR, Brasil, 2019

Variáveis	Criança colonizada por <i>S. aureus</i>		Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
	Sim n %	Não n %		
Idade das mães				
≤ 30 anos	26 (22,2%)	91 (77,8%)	1,109 (0,557 -2,208)	0,768
>30 anos	17 (20,5%)	66 (79,5%)		
Hospitalização prévia*				
Sim	2 (40,0%)	3 (60,0%)	2,504 (0,405 -15,486)	0,293
Não	41 (21,0%)	154 (79,9%)		
Uso prévio de antimicrobianos**				
Sim	5 (22,7%)	17 (77,3%)	1,084 (0,376 –3,126)	0,882
Não	38 (21,3%)	140 (78,7%)		
Familiar trabalhador da saúde				
Sim	6 (35,3)	11 (64,7)	1,146 (0,404-3,250)	0,797
Não	59 (32,2)	124 (67,8)		

*Criança internada até 5 dias nos últimos 6 meses. **Uso de antimicrobianos nos últimos 6 meses. Os dados categóricos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado.

Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as cepas de *S. aureus* de crianças, 52,4% das cepas MSSA e 74% das cepas MRSA apresentaram resistência concomitante a clindamicina; 26,2% das cepas MSSA e 34,7% das MRSA apresentaram resistência para sulfametoxazol-trimetoprima. Menos de 10% das cepas de MSSA e MRSA foram resistentes a rifampicina. Com relação ao perfil de sensibilidade à vancomicina, não foi identificada nenhuma cepa VISA ou hVISA (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil de sensibilidades aos antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à oxacilina, Londrina, PR, Brasil, 2019

Antimicrobiano	MSSA (n=42)	MRSA (n=23)
	Sensível	Sensível
Clindamicina	20 (47,6%)	6 (26,0%)
Eritromicina	7 (16,6%)	4 (69,5%)
Penicilina	1 (2,3%)	0 (0%)
Cefoxitina	42 (100%)	0 (0%)
Ciprofloxacino	36 (85,7%)	14 (60,8%)
Gentamicina	41 (97,6%)	19 (82,6%)
Tetraciclina	36 (85,7%)	8 (34,7%)
Tigeciclina	42 (100%)	16 (69,5%)
Linezolida	42 (100%)	23 (100%)
Rifampicina	40 (95,2%)	21 (91,3%)
Sulfametoxazol trimetoprima	31 (73,8%)	8 (34,7%)
Vancomicina	42 (100,0%)	23 (100,0%)

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a metilina. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a metilina.

DISCUSSÃO

Houve associação significativa de colonização por *S. aureus* entre mães e seus filhos. No Brasil existem poucos estudos sobre a epidemiologia do *S. aureus* comunitário no binômio mãe-criança, nesse sentido, não conseguimos identificar dados nacionais relatando informações semelhantes as deste estudo. No entanto, pesquisadores Chineses e Angolanos identificaram frequência de 26,1% e 10,1% de colonização de mães e seus respectivos filhos (LIN; YAO, 2018; RODRIGUES et al., 2018). Já em um Hospital Universitário da Argélia, 104 amostras de *S. aureus* de mãe e filhos foram isoladas, contudo, nenhuma relação entre mães e crianças infectadas foi confirmada (DJOUADI et al., 2014).

A frequência de MRSA no presente estudo foi elevado, quando comparado aos dados reportados pela literatura. Em 2015 pesquisadores norte-americanos reportaram 16% de colonização por MRSA em crianças (KNOX et al., 2015). Em uma meta-análise Lin et al (2016) relatou frequências de colonização por MRSA em crianças com variação de 1,0% a 19,1%. Em Vitória da Conquista - BA, foi realizado um estudo que obteve 148 amostras de swab nasal de crianças saudáveis, sendo que o *S. aureus* foi recuperado em 47,3% da população analisada, sendo 15,7% dos isolados positivos para MRSA (CARVALHO et al., 2017a). Um estudo realizado por Rodrigues et al. (2018), identificou a colonização por MRSA em crianças hospitalizadas (15,7%) e seus respectivos pais (10,1%). Pesquisadores iranianos relataram taxa de 5,8% de colonização por MRSA em crianças saudáveis (MOBASHERIZADEH et al., 2019).

A colonização por *S. aureus* e MRSA foi mais frequente nas crianças do sexo feminino. Em Atlanta, nos EUA, a colonização por *S. aureus* também foi mais frequente no sexo feminino (IMMERGLUCK et al., 2019). No entanto, outros estudos sugerem maior propensão do sexo masculino à colonização por MRSA (JOACHIM et al., 2017; SOLTANI et al., 2014; THOMSEN et al., 2019). A divergência do presente estudo com relação ao gênero pode ser justificada pela maior proporção do número de indivíduos do sexo feminino (n=109) em relação aos do sexo masculino (n=91).

Apesar de fatores como: uso de antibiótico recente, doença crônica e internação nos últimos seis meses estarem descritos na literatura como fatores de riscos para colonização de MSSA e MRSA (PAN et al., 2019), o presente estudo não encontrou resultados significativos com relação a essas variáveis. Uma provável justificativa pode ser porque estes fatores estão mais frequentemente relacionados à colonização por bacilos Gram-negativos multirresistentes.

Identificamos um aumento significativo de colonização por *S. aureus* nas crianças maiores de seis anos de idade. É possível que isso seja justificado por tempo maior de frequência na escola. Após revisão de três estudos, Knox et al. (2015) encontraram relação entre colonização por *S. aureus* e maior tempo de frequência à escola. Shetty et al. (2014) relataram maior frequência de *S. aureus* em idade escolar, assim como Joachim et al. (2017), que constataram elevadas taxas de colonização por *S. aureus* em crianças da educação primária.

Em contrapartida, crianças menores de seis anos de idade apresentaram maiores índices de colonização por MRSA. Nesse sentido, o estudo de Davoodabadi

et al. (2016), com 345 crianças saudáveis em 15 creches da cidade Isfahan, no Iran; e em uma meta-análise de prevalência realizada na China por Lin et al. (2016), corroboram com nossos achados. Nossas evidências sobre o perfil de *S. aureus* por faixa-etária aparentemente são um indicador importante para a prática clínica; conhecer as tendências do tipo de colonização por idade pode ser fundamental na escolha da terapia empírica adequada nas infecções estafilocócicas. Os fatores de riscos analisados não foram capazes de justificar o aumento do CA-MRSA na população mais jovem e novos estudos são necessários para confirmar esses achados.

Quanto à elevada resistência à clindamicina para as cepas de MRSA e MRSA, nossos dados são comparáveis aos encontrados por Ensinck et al. (2018) que acompanharam durante seis anos crianças colonizadas por CA-MRSA em um hospital argentino. O perfil de sensibilidade para sulfametoxazol-trimetoprima também foi baixo para as cepas de MRSA, diferentemente da literatura que relatam taxas de 80 a 90% de sensibilidade a sulfametoxazol-trimetoprima (PATERNINA-DE LA OSSA et al., 2018; WANG et al., 2018). Por outro lado, a ampla sensibilidade à vancomicina, rifampicina e linezolida para as cepas MRSA estão de acordo com a literatura (JOACHIM et al., 2017; LIN; YAO, 2018; WONG et al., 2018).

As variáveis clínicas-demográficas testadas no presente estudo não estavam associadas à colonização materna. Com relação ao menor índice de colonização materna por *S. aureus* em relação às crianças, não encontramos estudos semelhantes que compararam as proporções de colonização por *S. aureus* entre mãe e criança. No entanto, Davoodabadi et al. (2016) demonstram frequências proporcionais de colonização por *S. aureus* entre mães e recém nascidos, logo após o nascimento.

CONCLUSÃO

A presença de colonização por CA-MRSA em crianças e suas mães atendidas em um pronto-socorro público de referência do norte do Paraná, demonstra o risco elevado desta população adentrar com esse microrganismo no ambiente hospitalar, propiciando a disseminação para outros pacientes. Vale ressaltar também que crianças colonizadas por CA-MRSA podem desenvolver

infecção por este mesmo microrganismo, sendo necessário terapia antimicrobiana adequada para estes pacientes.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, S. P. DE et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 464–467, jul. 2017.
- CHEN, B. J. et al. Factors associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among the general population at a Medical College Campus in Guangzhou, South China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 28, dez. 2017.
- CHEN, C.-J.; HUANG, Y.-C. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 605–623, jul. 2014.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. CLSI document M02-A11**. 11. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S22**. 22. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100S**. 26. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100**. 27. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- DAVOODABADI, F. et al. Nasal colonization in children with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, 2016.
- DEN HEIJER, C. D. J. et al. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 409–415, maio 2013.
- DJOUDI, F. et al. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez des mères et des enfants hospitalisés à Alger : prédominance du clone virulent européen. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 5, p. 232–233, maio 2014.
- ENSINCK, G. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: 10-years' experience in a children's hospital in the city of Rosario, Argentina. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 116, n. 2, p. 119–125, abr. 2018.
- EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. 7.1 ed. [s.l.] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017.

- GORWITZ, R. J. J. et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, maio 2008.
- IMMERGLUCK, L. C. et al. Geographic surveillance of community associated MRSA infections in children using electronic health record data. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 170, dez. 2019.
- JOACHIM, A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on admission among patients attending regional hospitals in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 417, dez. 2017.
- JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.
- KHATIB, R. et al. Screening for Intermediately Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Heteroresistant *Staphylococcus aureus* by Use of Vancomycin-Supplemented Brain Heart Infusion Agar Biplates: Defining Growth Interpretation Criteria Based on Gold Standard Confirmati. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3543–3546, nov. 2015.
- KNOX, J. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission in households of infected cases: a pooled analysis of primary data from three studies across international settings. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 2, p. 354–365, jan. 2015.
- LIN, J. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in Chinese Children: A Prevalence Meta-Analysis and Review of Influencing Factors. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159728, jul. 2016.
- LIN, J.; YAO, Z. Maternal-Infant Correlation of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage: A Prospective Cohort Study. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. December, p. 1–7, dez. 2018.
- MOBASHERIZADEH, S. et al. Molecular characterization and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal carriage of healthy Iranian children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 374–378, mar. 2019.
- PAN, H. et al. Prevalence of and risk factors for nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among children in central Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 52, n. 1, p. 45–53, fev. 2019.
- PATERNINA-DE LA OSSA, R. et al. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 371–376, set. 2018.
- RODRIGUES, S. et al. Frequent MRSA nasal colonization among hospitalized children and their parents in Angola and São Tomé and Príncipe. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. 344–349, nov. 2018.

- SAADATIAN-ELAHI, M. et al. Basic Rules of Hygiene Protect Health Care and Lab Workers from Nasal Colonization by *Staphylococcus aureus*: An International Cross-Sectional Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82851, dez. 2013.
- SHETTY, V. et al. Prevalence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization Among Children. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. DC12–DC15, 2014.
- SOLTANI, B. et al. Risk Factors for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization of Healthy Children. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1–6, set. 2014.
- THOMSEN, I. P. et al. Molecular Epidemiology of Invasive *Staphylococcus aureus* Infections and Concordance with Colonization Isolates. **The Journal of Pediatrics**, v. 210, p. 173–177, jul. 2019.
- WANG, X. et al. Molecular Characteristics of Community-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates From Pediatric Patients With Bloodstream Infections Between 2012 and 2017 in Shanghai, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. June, p. 1–9, jun. 2018.
- WONG, J. W. H. et al. Prevalence and risk factors of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in Asia-Pacific region from 2000 to 2016: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Epidemiology**, v. 10, p. 1489–1501, 2018.

5.2 ARTIGO 2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A METICILINA ADQUIRIDO NA COMUNIDADE (CA-MRSA) DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL

RESUMO

Staphylococcus aureus são patógenos versáteis que ocasionam grande diversidade de infecções. Essas podem ser restritas aos tecidos superficiais, como nas infecções de pele, ou sistêmicas, caso das bacteremias. Recentemente, de acordo com suas características, isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) vêm sendo classificados como adquiridos na comunidade (CA-MRSA) ou no hospital (HA-MRSA). Portanto, esse estudo teve como objetivo determinar a prevalência de isolados MRSA em crianças atendidas em um hospital universitário do sul do Brasil. No período de maio de 2018 a abril de 2019 foram isolados 64 *S. aureus* coletados de 200 crianças atendidas no setor de pronto atendimento provenientes de culturas nasais, orais, axilares e inguinais. Os isolados foram identificados utilizando métodos fenotípicos e genotípicos. A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada por técnica de disco de difusão e os genes de resistência aos beta-lactâmicos (*mecA*), bem como a tipagem dos elementos *SCCmec*, para isolados MRSA, e genes de virulência que codificam a formação de biofilme (*icaA*), leucocidina de Panton-Valentine (*lukS-PV-lukF-PV*) e toxina da síndrome do choque tóxico (*tssT*) foram determinados por técnicas de PCR. A diversidade genética foi avaliada utilizando técnicas de REP-PCR e técnicas de RTq-PCR foram realizadas para obter *sequence typing* e *clonal complex*. Quanto a sensibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que 34,38% (22/64) eram resistentes a cefoxitina, enquanto 65,62% (42/64) eram sensíveis. Quanto a tipagem dos elementos *SCCmec*, foi encontrada maior frequência de isolados que continham o cassete tipo IV (50%). Entre os isolados MRSA, 92% foram positivos para o gene *icaA*, 44% para leucocidina de Panton-Valentine e 32% para *tssT*. Os isolados desse estudo foram agrupados em 12 diferentes clusters, 5 ST's e 4 CC's. Com os dados obtidos neste estudo foi possível observar a presença de isolados CA-MRSA portadores de genes de virulência em crianças da comunidade.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Criança, *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus estão entre os patógenos humanos mais comuns em todo mundo, podendo causar diversos tipos de infecções, que variam de superficiais, como as lesões de pele e tecidos moles, a doenças invasivas e potencialmente fatais, como sepse, pneumonia necrotizante (TONG et al., 2015).

Entre os desafios terapêuticos mais significativos destaca-se a emergência de *S. aureus* resistente a meticilina (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), comumente associado a infecções hospitalares (*Hospital acquired Methicillin-resistant S. aureus* – HA-MRSA). Entretanto, desde a década de 90, MRSA tem sido detectado em indivíduos sem fatores de risco para infecção, referidos como *S. aureus* resistentes a meticilina adquiridos na comunidade (*Community-acquired MRSA- CA-MRSA*) (ARAÚJO; GALDINO; AMARAL, 2011)

A resistência a meticilina é atribuída à presença do gene *mecA*, o qual codifica uma proteína de ligação à penicilina (*Penicillin Binding Protein* – PBP) modificada, a PBP2a, que apresenta baixa afinidade pelos betalactâmicos. O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel conhecido como Cassete Cromossômico Estafilocócico (*Staphylococcal Chromosome Cassette* - SCC*mec*). HA-MRSA comumente apresentam os SCC*mec* tipo I a III, enquanto nos CA-MRSA, os tipos IV e V são os mais frequentes (SHORE et al., 2011; WATANABE et al., 2009).

No Brasil, diversos estudos epidemiológicos têm avaliado a frequência de MRSA em pacientes adultos e hospitalizados, porém, pouco se sabe acerca da epidemiologia, das características moleculares e da virulência de CA-MRSA em crianças saudáveis. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de MRSA em crianças saudáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 64 isolados de *S. aureus* foram identificados de 200 crianças atendidas no setor de pronto atendimento de um hospital na região sul do Brasil, no período de maio de 2018 a abril de 2019. Estes microrganismos foram isolados de amostras nasais, orais, axilares e inguinais de crianças, com idade de um mês a 12 anos, estocados em caldo de soja e tripticaseína (*Tryptone Soya Broth* – TSB)

contendo 30% de glicerina a -80°C . Para realização da caracterização fenotípica e molecular os isolados de *S. aureus* foram reativadas em caldo TSB e cultivadas em ágar manitol salgado (JORGENSEN et al., 2015). A identificação da espécie foi realizada por metodologia padrão e confirmada por método molecular, utilizando-se o gene da coagulase (*coa*), de acordo com Tiwari, Sapkota e Sen (2008) e o gene codificante de termonuclease (*nuc*) de acordo com Hirota et al. (2011).

A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de disco difusão para cefoxitina (30 μg), penicilina (10 U), eritromicina (15 μg), clindamicina (2 μg), gentamicina (10 μg), ciprofloxacina (5 μg), sulfametoxazol-trimetoprima (23,75/1,25 μg), rifampicina (5 μg), linezolid (10 μg) and tigeciclina (15 μg), de acordo com o *Clinical Laboratory Institute Standards* (CLSI, 2018).

A sensibilidade a meticilina foi detectada por métodos fenotípicos utilizando a técnica de disco de difusão e por método genotípico, reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do gene *mecA*. Os isolados positivos para o gene foram submetidas à tipagem SCC*mec* de acordo com Milheiriço, Oliveira e Lencastre (2007).

A detecção dos genes de virulência: leucocidina de Pantón-Valentine (*lukS-PV-lukF-PV*); toxina da síndrome do choque tóxico-1 (*tsst*) e de biofilme (*icaA*) foram realizadas como descrito por Campbell et al. (2008).

A diversidade genética entre os isolados *mecA* positivos foi analisada pela técnica de PCR, baseada em sequência de elementos repetitivos (*repetitive element sequence-based* PCR – REP-PCR), usando o primer RW3A como descrito por Del Vecchio et al. (1995). Os padrões de bandas foram categorizados utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (SNEATH; SOKAL, 1973) do *software* Bionumerics v.6.5 (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium), com a tolerância de banda definida em 3% e o valor limite de corte definido em 80%.

A análise estatística foi realizada com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows. As variáveis foram apresentadas em valores absolutos e em frequências. Variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado. Foram consideradas estatisticamente significativas as variáveis que apresentam p com valor $< 0,05$.

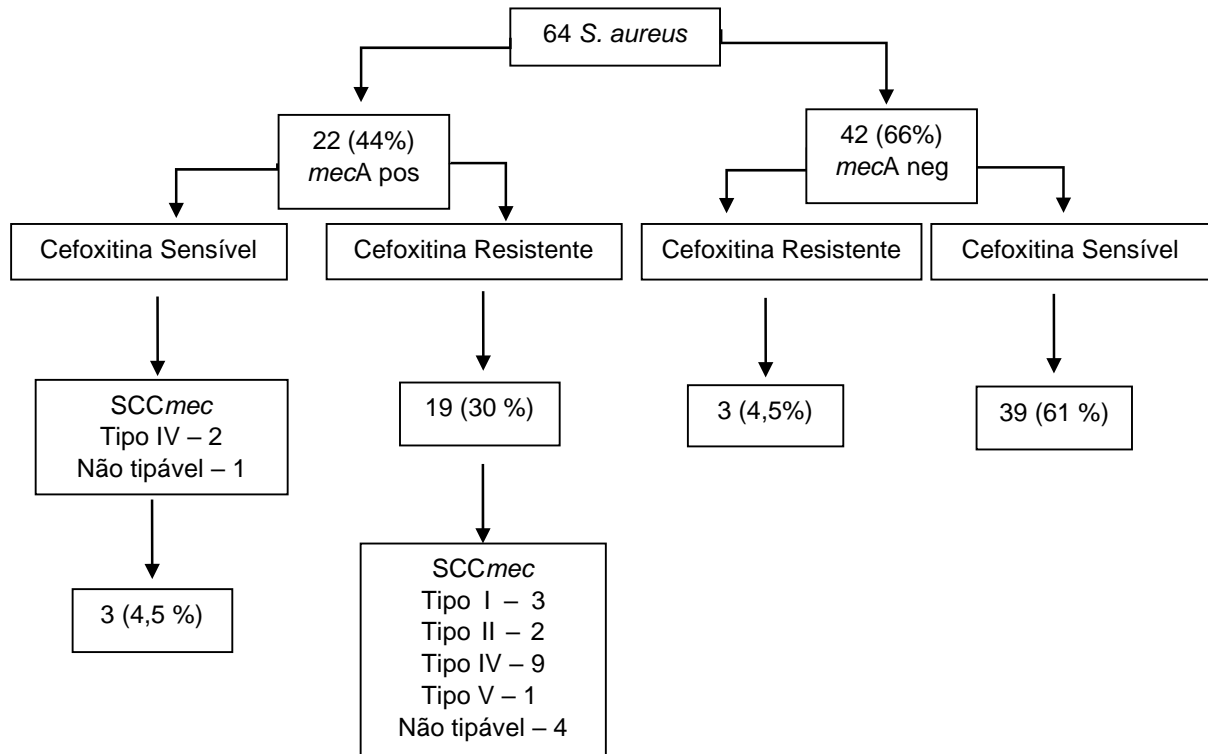
O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL) sob o número CAAE: 86708018.4.0000.5231.

RESULTADOS

A sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada para os 64 isolados de *S. aureus*. Verificou-se que 34,38% (22/64) eram resistentes a cefoxitina, enquanto 65,62% (42/64) eram sensíveis.

Entre os isolados caracterizados como resistente, fenotipicamente, 19/22 (86,36%) foram positivos para gene *mecA* e 3/22 (13,64%) não o amplificaram. Ainda, entre os isolados que se mostraram sensíveis, no método fenotípico, 3/42 (7,14%) foram positivos para pesquisa do gene *mecA*. Dessa forma, esses isolados, foram caracterizados como *S. aureus* sensíveis a oxacilina-*mecA* positivo (*Oxacillin-sensible* MRSA – OS-MRSA). Portanto, de acordo com os critérios do CLSI (2018), entre todos os isolados testados 25/64 (39,06%) foram considerados MRSA e 39/64 (60,94%) como MSSA.

Figura 2 – Caracterização dos 64 isolados de *Staphylococcus aureus* comunitários, provenientes de crianças. Sensibilidade a cefoxitina, presença do gene *mecA* e tipagem dos elementos *SCCmec*



Quanto ao perfil de sensibilidade *in vitro* observamos elevada resistência a eritromicina, tanto para o grupo MSSA quanto para MRSA, 76 e 71%, respectivamente. Da mesma forma, 43% dos MSSA e 58% dos MRSA eram resistentes a clindamicina. Ao contrário, a resistência a ciprofloxacina e gentamicina foi menor, 3% para MSSA e 12% para MRSA. Não foi identificado nenhum *S. aureus* resistente a linezolida, tigeciclina e rifampicina.

A tipagem *SCCmec*, realizada para 22 isolados, identificou o cassete do tipo I em 13,64% (3/ 22) dos isolados, o tipo II em 9,09 % (2/ 22), o tipo IV em 50% (11/ 22), o tipo V em 4,54% (1/ 22) e 27,73% (5/ 22) foram classificados como não tipáveis. A Figura 2 exemplifica o fluxo de tipagens moleculares de acordo com os resultados de cefoxitina e pesquisa do gene *mecA*, bem como a tipagem dos elementos *SCCmec*.

Foram pesquisados genes que codificam para fatores de virulência como o biofilme, gene *icaA*, Leucocidina de Pantón Valentine, genes *lukS-PV / lukF-PV* e toxina da síndrome do choque tóxico, gene *tsst*. O gene *icaA* foi o encontrado em maior frequência, tanto nos isolados MSSA, presente em 82,1% (32/39) deles, como nos MRSA 92% (23/25). Já o gene que codifica para Leucocidina de Pantón- Valentine foi encontrado em 44% (11/ 25) dos MRSA e 48,7% (19/ 39) dos MSSA. O gene *tsst* foi positivo em 32% (8/ 25) e 23,1% (9/ 39) dos isolados MRSA e MSSA,

respectivamente. Entretanto, como descrito na Tabela 5, esses dados não foram estatisticamente significativos.

Tabela 5 – Análise da associação dos genes de virulência *lukS-PV / lukF-PV*, *tsst* e *icaA* e resistência a meticilina entre 25 amostras de MRSA e 39 de MSSA, isolados de crianças (n=329)

Genes	MRSA	MSSA	OR	p valor
<i>lukS-PV / lukF-PV</i>				
Negativo	14 (56,0%)	20 (51,3%)	0,827 (0,302 - 2,268)	0,712
Positivo	11 (44,0%)	19 (48,7%)		
<i>tsst</i>				
Negativo	17 (68,0%)	30 (76,9%)	1,569 (0,510 - 4,822)	0,430
Positivo	8 (32,0%)	9 (23,1%)		
<i>icaA</i>				
Negativo	2 (8,0%)	7 (17,9%)	2,516(0,478 - 13,234)	0,463
Positivo	23 (92,0%)	32 (82,1%)		

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina. OR: odds ratio. *lukS-PV / lukF-PV*: Genes codificadores da leucocidina de Pantón- Valentine. *tsst*: Gene da Toxina da Síndrome do choque tóxico. *IcaA*: Gene relacionado a produção de biofilme.

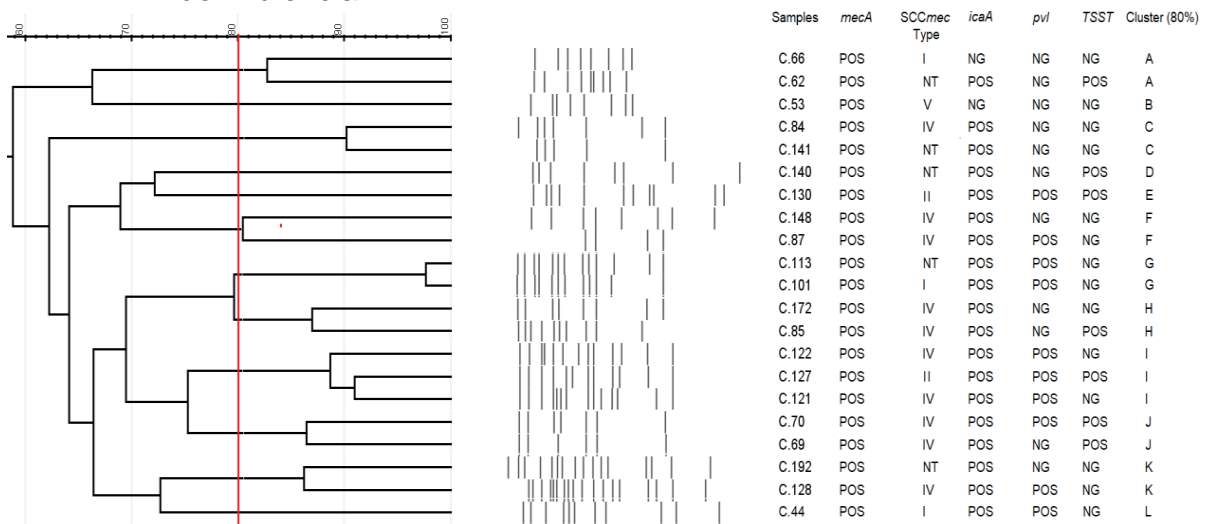
A presença de genes de virulência também foi avaliada de acordo com os tipos de SCCmec, como pode ser verificado na Tabela 6.

Tabela 6 – Frequência de genes de virulência de 21 amostras de *Staphylococcus aureus mecA* positivo de acordo o tipo de SCCmec

Gene	SCCmec I (n - 3)	SCCmec II (n - 2)	SCCmec IV (n - 11)	NT (5)	total
<i>lukS-PV-lukF-PV</i>	02 (67%)	02 (100%)	05 (45%)	01 (20%)	10
<i>Tsst</i>	00 (00)	02 (100%)	03 (27%)	02 (40%)	7
<i>icaA</i>	02 (67%)	02 (100%)	11 (100%)	05 (100%)	20

Para 21 isolados MRSA comunitários isolados de crianças foi avaliado o perfil de similaridade, pela técnica REP-PCR. Os isolados foram agrupados em 12 diferentes *clusters* (A a L). A Figura 3 mostra o dendrograma com o perfil de similaridade, tipagem SCCmec e fatores de virulência.

Figura 3 – Características moleculares de 21 amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) por REP-PCR, tipagem SCCmec e genes de virulência



A relação genética de todos os MRSA foi analisada por PCR baseada em sequência de elementos repetitivos (REP-PCR) usando o primer RW3A como descrito por Del Vecchio et al. (1995). Os padrões de bandas que tinham mais de uma banda diferindo em tamanho foram considerados tipos diferentes de REP-PCR (VAN DER ZEE et al., 1999). Padrões de bandas foram categorizados usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (SNEATH; SOKAL, 1973) do *software* Bionumerics v.6.5 (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium), com a tolerância de banda definida em 3% e o valor limite de corte definido em 80%. POS: positivo. NG: negativo. NT: não tipável.

Entre os isolados MRSA comunitários que tiveram seus perfis de similaridade analisados, como descrito acima, dos que possuíam SCCmec tipo IV, sete foram selecionados, para tipagem do complexo clonal (CC) e *Sequence Typing* (ST)

utilizando técnicas de RTq-PCR de acordo com o preconizado por Lilliebridge et al. (2011) (Tabela 7).

Tabela 7 – Caracterização do complexo clonal e *sequence typing* de sete isolados MRSA SCCmec tipo IV

Isolado	ST	CC	SCCmec	icaA	pvl	tsst	Cluster
C 70	30	30	IV	POS	POS	POS	J
C 121	6	5	IV	POS	POS	NG	I
C 84	4	45	IV	POS	NG	NG	C
C 69	328	5	IV	POS	NG	POS	J
C 85	30	30	IV	POS	NG	POS	H
C 122	30	30	IV	POS	POS	NG	I
C 148	873	873	IV	POS	NG	NG	F

POS: positive. NG: negative. CC: complexo clonal. ST: *Sequence Typing*. SCCmec: *Staphylococcal chromosome cassette mec*. icaA: gene biofilme. pvl: gene leucocidina de Pantón-Valentine. tsst: gene síndrome do choque tóxico.

DISCUSSÃO

Neste estudo verificou-se elevada prevalência de colonização por *S. aureus* resistente a meticilina comunitário (CA-MRSA) em crianças da comunidade, em um serviço de referência do sul do Brasil. Diferente do que se encontra na literatura, os isolados desse estudo não apresentam PVL como um marcador de CA-MRSA e são resistentes a diversos antimicrobianos não beta lactâmicos.

Isolados caracterizados como CA-MRSA são de grande importância clínica e epidemiológica. Esses, além de ocasionarem processos infecciosos até mesmo em indivíduos imunocompetentes, apresentam grande potencial de virulência e de disseminação, mesmo no ambiente comunitário. A prevalência de portadores nasais varia de 0,4% a cerca de 40% (DAVOODABADI et al., 2016; ESCOBAR-PEREZ et al., 2017; NIMMO, 2012; RAVEN et al., 2019).

Lamaro-Cardoso et al. (2009) encontraram uma prevalência de CA-MRSA de 1,2% em crianças com idade pré-escolar. Já em outro estudo conduzido por Bes et al. (2018), essa frequência, em pessoas adultas, foi de 2,3%. Por outro lado, Braga et al. (2014), num estudo que avaliou 500 crianças atendidas em um centro de cuidados diários, com idade de três meses a seis anos, verificou que 6,2% eram colonizadas por *S. aureus* resistentes, resultados semelhantes ao verificado nesse trabalho (5,5%).

Estudos prévios têm reportado um clone de CA-MRSA pandêmico conhecido como USA300, que circula principalmente na América do Norte. Contudo esse já foi relatado em todos os outros continentes (DIEKEMA et al., 2014; ESCOBAR-PEREZ et al., 2017; NIMMO, 2012). Este clone é portador da toxina PVL e sensível a antimicrobianos não beta-lactâmicos.

Recentemente, no entanto, tem sido verificada a emergência de novos clones e a disseminação, não só na comunidade como também em hospitais. A presença de PVL e a sensibilidade aos antimicrobianos tem sido variável entre estes novos CA-MRSA. Isolados com diferentes características estão espalhados ao redor do mundo e predominam, com suas particularidades nas diferentes regiões (EDSLEV et al., 2018).

É possível observar que esse patógeno está presente em várias regiões do mundo, com frequências e mecanismos de resistência distintos. Em estudo realizado por Paternina-De La Ossa et al. (2018) isso fica evidente, mostrando inclusive aumento de casos de CA-MRSA de 19,7% (2007) para 36,4% (2011) no Canadá e aumento de 0,43% (2004-2007) para 5,44% (2008-2012) na Espanha. No Brasil o autor descreve uma taxa 8,7% de CA-MRSA em colonização nasal. Por outro lado, nosso estudo mostrou uma frequência de 34,37% de CA-MRSA em crianças, com frequência próxima à que foi descrita no Canadá.

Laub et al. (2018), avaliaram amostras nasais, coletadas em 2012 na Hungria, de 1.390 crianças saudáveis, com idades entre 3 e 7 anos. A frequência de *S. aureus* encontrada foi de 34,1%, contudo, apenas 0,8% deles CA-MRSA. Todos os MRSA apresentaram o SCCmec tipo IV, e as seguintes taxas de resistência: 0,2% para ciprofloxacina, 0,6% para gentamicina e oxacilina, 9,5% para clindamicina, 10,3% para eritromicina e 91,4% para penicilina, geralmente mais baixos em comparação com isolados clínicos húngaros.

Na Índia, Dey et al. (2013) avaliaram um total de 1.002 crianças quanto à colonização por MRSA e verificaram que MRSA comunitários apresentavam resistência não apenas a uma classe de antimicrobianos, mas a multirresistência era comum. Numa outra avaliação de resistência a antimicrobianos, realizada no Iran em 2016, verificou-se que todos os isolados eram resistentes a penicilina e a cefoxitina. Neste mesmo estudo a resistência a eritromicina foi de 45%, enquanto a clindamicina foi de 20% e a gentamicina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima foi de 10%, entre os CA-MRSA (DAVOODABADI et al., 2016).

Estes achados apresentam algumas discordâncias dos verificados nesta pesquisa. A resistência a cefoxitina não foi de 100%, a despeito da presença do gene *mecA*, a resistência a clindamicina e a sulfametoxazol-trimetoprima foram maiores e, por outro lado, nenhum dos nossos isolados foi resistente a rifampicina.

A tipagem dos elementos *SCCmec* é de extrema importância para a detecção da origem do isolado. Sabe-se que isolados que contêm os cassetes dos tipos I ao III, até recentemente, eram mais frequentemente encontrados em amostras hospitalares. Já aqueles que contêm os elementos IV, V e IV podem ser relacionados aos patógenos de origem comunitária (PENG; LIU; MA; GAO, 2018). Nesse estudo 54,54% dos isolados MRSA podem ser classificados, com base nesse critério, como isolados CA-MRSA.

Isolados MRSA comunitários relacionados ao *SCCmec* tipo IV têm sido descritos desde a década de 90. Eles são resistentes apenas a beta-lactâmicos e portadores de PVL. Pesquisadores iranianos relataram 44% de *SCCmec* tipo IV em crianças (MOBASHERIZADEH et al., 2019). Na China Wang et al. (2018) identificaram 59,3% de *SCCmec* do tipo IV em crianças da comunidade da cidade de Shanghai. No Brasil, Carvalho et al (2017) encontraram maior prevalência do *SCCmec* do tipo IV (27,2%) em crianças saudáveis que frequentavam creche local.

De acordo com o descrito por Machuca, González e Sosa (2014) isolados CA-MRSA, além de apresentarem aumentando de sua frequência, em isolados de origem de hospitalar, em países como França, Itália, EUA, Brasil, Argentina, contam com a característica marcante da sensibilidade aos antimicrobianos, o *SCCmec* do tipo IV e a presença do gene *pvl*. Em nosso estudo 45% dos isolados que continham o cassete tipo IV foram apresentavam esse gene.

Nos Estados Unidos, estudos prévios têm reportado que CA-MRSA pertencentes ao clone ST8/*SCCmec* tipo IV/PVL+ estão extremamente disseminados (NIMMO, 2012; TOLEMAN et al., 2016). No Japão a prevalência de CA-MRSA é menor do que a verificada nos Estados Unidos, e os clones são diferentes. Em outras partes do mundo, infecções comunitárias por MRSA, também são causadas por clones de CA-MRSA diferentes como o clone Pacífico Sul ST30/*SCCmec*IV/PVL+, o clone Taiwan ST 59/*SCCmec*V/PVL+ e o Europeu ST80/*SCCmec*IV/PVL+ (CHAMBERS; DELEO, 2009).

Em nosso estudo é possível observar a diferença dos clones epidêmicos CA-MRSA. Nossos isolados estão inseridos em cinco ST's diferentes, sendo prevalentes

os isolados CA-MRSA ST 30/CC30/SCC*mec* tipo IV. De acordo com Papadimitriou-Olivgeris et al. (2017) isolados pertencentes ao CC30 (ST30) *tsst* positivos são patógenos de sucesso, distribuídos internacionalmente, pois carregam em seu genoma ilhas de patogenicidade.

Esses isolados são mais prevalentes em colonização em neonatos na Suíça (39%) e estão presentes em 20% dos processos infecciosos, segundo o autor. Entre nossos isolados, dois foram classificados como CC30/ST30 *tsst* positivo. De acordo com o descrito por Lepuschitz et al. (2018), isolados MRSA pertencentes ao CC 30 são prevalentes em países da Ásia e sudeste do pacífico. Isso deixa evidente a grande capacidade do patógeno de se dispersar entre as diferentes regiões do globo, o que o torna um patógeno de grande interesse epidemiológico.

Pensando na facilidade de dispersão e capacidade de infecção do patógeno é importante buscar alguns de seus fatores de virulência. Nesse estudo, 44% dos isolados MRSA apresentarem o gene *pvl*, 32% foram positivos para *tsst* e 92% foram positivos para o gene *icaA*. Resultado diferente foi encontrado em pesquisa conduzida com 835 isolados coletados entre 2012 – 2017 de pacientes na China. Os pesquisadores encontraram apenas um isolado positivo para o gene *tsst* e 53,1% positivos para o gene *pvl*. Isso mostra o potencial patogênico de nossos isolados e a importância dos dados epidemiológicos locais para implementação de medidas eficazes no tratamento clínico (PENG et al., 2018).

A maioria dos isolados foram positivos para o gene que codifica a produção de biofilme (*icaA*). Essa característica é de extrema importância, pois auxilia os microrganismos a na fuga dos mecanismos de defesa, além de atuar como um importante fator de resistência aos antimicrobianos (JOSHI et al., 2018). No Brasil é possível encontrar taxas elevadas de isolados MRSA e MSSA produtoras de biofilme em crianças da comunidade. Em pesquisa realizada por Carvalho et al. (2017) foi encontrado 88,8% e 61,0% de isolados MRSA e MSSA produtoras de biofilme, respectivamente.

Wang et al. (2018) reportaram frequências de PVL de 37,0% em MRSA e 7,8% para MSSA na China, mais elevadas em relação à verificada neste estudo. Por outro lado, um estudo de coorte realizado com famílias australianas identificou 64% do gene *pvl* em crianças e adultos colonizados com CA-MRSA (NG et al., 2016). Em crianças internadas em um centro médico de Nova York, Thomsen et al. (2019) identificaram a PVL em 67,0% e 32,0% das cepas MRSA e MSSA, respectivamente.

Com relação à alta prevalência de PVL em cepas MSSA, Rodrigues et al. (2018) descreveram taxas (37,0%) semelhantes às nossas.

Ainda nesse estudo, foi possível observar isolados com perfil comparável aos OS-MRSA. Esses isolados que apresentam sensibilidade a oxacilina, a despeito da presença do gene *mecA*, são designados como OS-MRSA. Esses têm sido relatados em diversos estudos, com percentuais que variam de 0,62% a 33,7% na população geral (ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016; HOSOSAKA et al., 2007; SAKOULAS et al., 2001). Nosso grupo de pesquisa relatou em 2019 um caso de sepse fatal ocasionado por OS-MRSA em uma paciente cujo isolado foi identificado, fenotipicamente, como sendo MSSA (DUARTE et al., 2019). Nesse sentido, a colonização por OS-MRSA associada à não completa formação imunológica das crianças, e a impossibilidade de identificação por métodos fenotípicos, pode ser um fator de risco importante para as crianças da comunidade. Nesse estudo foi possível observar que 4,5% (3/22) dos isolados positivos para o gene *mecA* apresentaram sensibilidade, *in vitro*, para a oxacilina.

CONCLUSÃO

Com esse estudo foi possível identificar alta frequência de CA-MRSA em crianças atendidas em um hospital público da região sul do Brasil. Através da determinação das características moleculares de *S. aureus* confirmamos elevada prevalência do SCC*mec* do tipo IV. Os genes que codificam para a formação do biofilme e o gene *pvl* foram os fatores de virulência predominantes. Através da pesquisa dos cassetes cromossômicos, complexo clonal e *sequence typing* foi possível confirmar a presença de isolados com característica de CA-MRSA em crianças da comunidade.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 115, dez. 2016.
- ARAÚJO, J. M.; GALDINO, M.; AMARAL, S. M. MRSA de origem comunitária. **RESIDÊNCIA PEDIÁTRICA**, v. 1, n. 2, p. 39–40, 2011.
- BES, T. M. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in individuals from the community in the city of Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, out. 2018.
- BRAGA, E. D. V. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–10, dez. 2014.
- CAMPBELL, S. J. et al. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 678–684, fev. 2008.
- CARVALHO, S. P. DE et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 464–467, jul. 2017.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, set. 2009.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100**. 28. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- DAVOODABADI, F. et al. Nasal colonization in children with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, 2016.
- DEL VECCHIO, V. G. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2141–2144, ago. 1995.
- DEY, S. et al. Prevalence and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in children attending anganwaris (preschools) in Ujjain, India. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 265, 2013.
- DIEKEMA, D. J. et al. Continued Emergence of USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: Results from a Nationwide Surveillance Study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 3, p. 285–292, mar. 2014.

- DUARTE, F. C. et al. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 4, p. 293–297, abr. 2019.
- EDSLEV, S. M. et al. Identification of a PVL-negative SCC*mec*-IVa sublineage of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC80 lineage: understanding the clonal origin of CA-MRSA. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 273–278, mar. 2018.
- ESCOBAR-PEREZ, J. et al. Emergence and spread of a new community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Colombia. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 108, p. 1–10, dez. 2017.
- HIROTAKI, S. et al. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3627–3631, out. 2011.
- HOSOSAKA, Y. et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 2, p. 79–86, abr. 2007.
- JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.
- JOSHI, S. et al. Novel Miniature Membrane Active Lipopeptidomimetics against Planktonic and Biofilm Embedded Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1021, dez. 2018.
- LAMARO-CARDOSO, J. et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Infants Attending Day Care Centers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3991–3997, dez. 2009.
- LAUB, K. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriage among children in Szolnok, Hungary. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65, n. 1, p. 59–72, mar. 2018.
- LEPUSCHITZ, S. et al. Characterization of a community-acquired-MRSA USA300 isolate from a river sample in Austria and whole genome sequence based comparison to a diverse collection of USA300 isolates. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9467, dez. 2018.
- LILLIEBRIDGE, R. A. et al. The Utility of High-Resolution Melting Analysis of SNP Nucleated PCR Amplicons—An MLST Based *Staphylococcus aureus* Typing Scheme. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e19749, jun. 2011.
- MACHUCA, M. A.; GONZÁLEZ, C. I.; SOSA, L. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander. **Biomedica**, v. 34, n. Supl.1, p. 163–169, dez. 2014.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. DE. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3374–3377, set. 2007.

MOBASHERIZADEH, S. et al. Molecular characterization and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal carriage of healthy Iranian children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 374–378, mar. 2019.

NG, W. et al. Community- and Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: An Investigation Into Household Transmission, Risk Factors, and Environmental Contamination. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 1, p. 61–67, jan. 2016.

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

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Spread of *Tst*-Positive *Staphylococcus aureus* Strains Belonging to ST30 Clone among Patients and Healthcare Workers in Two Intensive Care Units. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 270, set. 2017.

PATERNINA-DE LA OSSA, R. et al. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 371–376, set. 2018.

PENG, H. et al. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17916, dez. 2018.

RAVEN, K. E. et al. Methodology for Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in a Routine Hospital Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, p. e00180-19, mar. 2019.

RODRIGUES, S. et al. Frequent MRSA nasal colonization among hospitalized children and their parents in Angola and São Tomé and Príncipe. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. 344–349, nov. 2018.

SAKOULAS, G. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*-Positive Susceptible Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3946–3951, nov. 2001.

SHORE, A. C. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. 1. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

THOMSEN, I. P. et al. Molecular Epidemiology of Invasive *Staphylococcus aureus* Infections and Concordance with Colonization Isolates. **The Journal of Pediatrics**, v. 210, p. 173–177, jul. 2019.

TIWARI, H. K.; SAPKOTA, D.; SEN, M. R. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (*coa*) gene PCR as the gold standard. **Nepal Medical College journal**, v. 10, n. 2, p. 129–131, jun. 2008.

TOLEMAN, M. S. et al. Systematic Surveillance Detects Multiple Silent Introductions and Household Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in the East of England. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 3, p. 447–453, ago. 2016.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.

WANG, X. et al. Molecular Characteristics of Community-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates From Pediatric Patients With Bloodstream Infections Between 2012 and 2017 in Shanghai, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. June, p. 1–9, jun. 2018.

WATANABE, S. et al. Genetic Diversity of Staphylocoagulase Genes (*coa*): Insight into the Evolution of Variable Chromosomal Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5714, 2009.

6 CONCLUSÕES

A presença de colonização por *S. aureus* em crianças atendidas em um pronto-socorro público de referência do norte do Paraná, demonstrou o risco elevado desta população adentrar com esse microrganismo no ambiente hospitalar.

A maioria das crianças colonizadas por *S. aureus* não tiveram mães colonizadas pelo mesmo microrganismo.

Os isolados de *S. aureus* apresentaram índices elevados de resistência a clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprima.

Foi identificada alta frequência de CA-MRSA nas crianças participantes desse estudo.

O gene SCCmec do tipo IV foi o mais prevalente entre os isolados de CA-MRSA.

Os fatores de virulência predominantes para o MSSA e CA-MRSA foram biofilme e PVL.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo demonstraram elevada frequência de colonização por *S. aureus* em crianças da comunidade, o que representa um alerta para o risco de disseminação deste microrganismo após admissão destas crianças no hospital.

Com a análise dos marcadores genéticos foi possível confirmar a presença de isolados CA-MRSA que foram sensíveis à oxacilina, porém apresentavam gene *mecA*. Portanto, é fundamental a utilização de novos métodos para a identificação do real perfil de sensibilidade do *S. aureus*, pois além de determinar a sua real prevalência podem orientar o manejo terapêutico para possíveis eventos infecciosos secundários.

REFERÊNCIAS

- ABDULGADER, S. M. et al. Longitudinal Population Dynamics of *Staphylococcus aureus* in the Nasopharynx During the First Year of Life. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1–10, mar. 2019.
- ALAKLOBI, F. et al. The prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among outpatient children in a tertiary hospital: A prospective observational study in Riyadh, Saudi Arabia. **International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 2, n. 3–4, p. 136–140, set. 2015.
- ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T. C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 115, dez. 2016.
- ANTRI, K. et al. High levels of *Staphylococcus aureus* and MRSA carriage in healthy population of Algiers revealed by additional enrichment and multisite screening. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 8, p. 1521–1529, ago. 2018.
- ARAÚJO, J. M.; GALDINO, M.; AMARAL, S. M. MRSA de origem comunitária. **RESIDÊNCIA PEDIÁTRICA**, v. 1, n. 2, p. 39–40, 2011.
- ARIAS, C. A. et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e00816-17, out. 2017.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- BAIG, S. et al. Novel SCC*mec* type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 74–76, jul. 2018.
- BES, T. M. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in individuals from the community in the city of Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, out. 2018.
- BOUAZZA, N. et al. Population pharmacokinetics of clindamycin orally and intravenously administered in patients with osteomyelitis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 971–977, dez. 2012.
- BRAGA, E. D. V. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–10, dez. 2014.

CAMPBELL, S. J. et al. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 678–684, fev. 2008.

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

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

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, set. 2009.

CHEN, B. J. et al. Factors associated with *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among the general population at a Medical College Campus in Guangzhou, South China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 28, dez. 2017.

CHEN, C.-J.; HUANG, Y.-C. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 605–623, jul. 2014.

CHEN, C. H. et al. Risk factors for and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among healthy children in southern Taiwan, 2005–2010. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 52, n. 6, p. 929–936, 2018.

CLARRIDGE, J. E. et al. Impact of Strain Typing Methods on Assessment of Relationship between Paired Nares and Wound Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 224–231, jan. 2013.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. CLSI document M02-A11**. 11. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S22**. 22. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100S**. 26. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100**. 27. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100**. 28. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

DA SILVEIRA, M. et al. Nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among elderly living in nursing homes in Brazil: risk factors and molecular epidemiology. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, n. 18, p. 1–5, dez. 2018.

DAVOODABADI, F. et al. Nasal colonization in children with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, 2016.

DEL VECCHIO, V. G. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2141–2144, ago. 1995.

DEN HEIJER, C. D. J. et al. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 409–415, maio 2013.

DEY, S. et al. Prevalence and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in children attending anganwaris (preschools) in Ujjain, India. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 265, 2013.

DIEKEMA, D. J. et al. Continued Emergence of USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: Results from a Nationwide Surveillance Study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 3, p. 285–292, mar. 2014.

DJOUADI, F. et al. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez des mères et des enfants hospitalisés à Alger : prédominance du clone virulent européen. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 5, p. 232–233, maio 2014.

DUARTE, F. C. et al. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 4, p. 293–297, abr. 2019.

EDSLEV, S. M. et al. Identification of a PVL-negative SCC*mec*-IVa sublineage of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC80 lineage: understanding the clonal origin of CA-MRSA. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 273–278, mar. 2018.

ENSINCK, G. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: 10-years' experience in a children's hospital in the city of Rosario, Argentina. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 116, n. 2, p. 119–125, abr. 2018.

ESCOBAR-PEREZ, J. et al. Emergence and spread of a new community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Colombia. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 108, p. 1–10, dez. 2017.

- EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. 7.1 ed. [s.l.] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017.
- FRANK, D. N. et al. The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10598, maio 2010.
- FRIEDRICH, R. et al. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 535–539, 2003.
- GIERSING, B. K. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2962–2966, jun. 2016.
- GORWITZ, R. J. J. et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, maio 2008.
- HALL, C. W.; MAH, T. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, maio 2017.
- HANCOCK, R. E. W. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 209–218, 2005.
- HARTMAN, B.; TOMASZ, A. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 5, p. 726–735, maio 1981.
- HIRAMATSU, K. et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection & Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 117, 2013.
- HIROTAKI, S. et al. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3627–3631, out. 2011.
- HOSOSAKA, Y. et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 2, p. 79–86, abr. 2007.
- IMMERGLUCK, L. C. et al. Geographic surveillance of community associated MRSA infections in children using electronic health record data. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 170, dez. 2019.
- JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 1, p. 1–21, fev. 2018.
- JOACHIM, A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on admission among patients attending regional hospitals in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 417, dez. 2017.
- JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015.

JOSHI, S. et al. Novel Miniature Membrane Active Lipopeptidomimetics against Planktonic and Biofilm Embedded Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1021, dez. 2018.

KASPAR, U. et al. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 2130–2142, jul. 2016.

KAYA, H. et al. SCC*mec*Finder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. e00612-17, fev. 2018.

KHATIB, R. et al. Screening for Intermediately Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Heteroresistant *Staphylococcus aureus* by Use of Vancomycin-Supplemented Brain Heart Infusion Agar Biplates: Defining Growth Interpretation Criteria Based on Gold Standard Confirmati. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3543–3546, nov. 2015.

KLUYTMANS, J. A. J. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 11–15, jan. 2010.

KNOX, J. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission in households of infected cases: a pooled analysis of primary data from three studies across international settings. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 2, p. 354–365, jan. 2015.

KROH, H. K.; PANIZZI, P.; BOCK, P. E. Von Willebrand factor-binding protein is a hysteretic conformational activator of prothrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 19, p. 7786–7791, maio 2009.

LAMARO-CARDOSO, J. et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Infants Attending Day Care Centers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3991–3997, dez. 2009.

LAUB, K. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriage among children in Szolnok, Hungary. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65, n. 1, p. 59–72, mar. 2018.

LEPUSCHITZ, S. et al. Characterization of a community-acquired-MRSA USA300 isolate from a river sample in Austria and whole genome sequence based comparison to a diverse collection of USA300 isolates. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9467, dez. 2018.

LILLIEBRIDGE, R. A. et al. The Utility of High-Resolution Melting Analysis of SNP Nucleated PCR Amplicons—An MLST Based *Staphylococcus aureus* Typing Scheme. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e19749, jun. 2011.

LIN, J. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in Chinese Children: A Prevalence Meta-Analysis and Review of Influencing Factors. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159728, jul. 2016.

LIN, J.; YAO, Z. Maternal-Infant Correlation of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage: A Prospective Cohort Study. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. December, p. 1–7, dez. 2018.

LIU, C. et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 3, p. e18–e55, fev. 2011.

LIU, J. et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 56–67, dez. 2016.

MACHUCA, M. A.; GONZÁLEZ, C. I.; SOSA, L. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander. **Biomedica**, v. 34, n. Supl.1, p. 163–169, dez. 2014.

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3057–3071, set. 2010.

MARTIROSOV, D. M. et al. Relationship between day 1 and day 2 Vancomycin area under the curve values and emergence of heterogeneous Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) by Etest® macromethod among patients with MRSA bloodstream infections: a pilot study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 534, dez. 2017.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. DE. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3374–3377, set. 2007.

MOBASHERIZADEH, S. et al. Molecular characterization and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal carriage of healthy Iranian children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 374–378, mar. 2019.

MORATA, L. et al. Risk Factors for a Low Linezolid Trough Plasma Concentration in Acute Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1913–1917, abr. 2013.

MOULAVI, P. et al. *Antibiofilm effect of green engineered silver nanoparticles fabricated from Artemisia scoporia extract on the expression of icaA and icaR genes against multidrug-resistant Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 701–712, jul. 2019.

MUTHUKRISHNAN, G. et al. Longitudinal genetic analyses of *Staphylococcus aureus* nasal carriage dynamics in a diverse population. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 221, p. 1–13, 2013.

NARAYANAN, N. et al. Evaluation of treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the obese patient. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 877–891, 2019.

- NG, W. et al. Community- and Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: An Investigation Into Household Transmission, Risk Factors, and Environmental Contamination. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 1, p. 61–67, jan. 2016.
- NIMMO, G. R. USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 8, p. 725–734, ago. 2012.
- NOUWEN, J. L. et al. Predicting the *Staphylococcus aureus* Nasal Carrier State: Derivation and Validation of a —Culture Rule. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 806–811, set. 2004.
- NOVICK, R. P.; BOUANCHAUD, D. EXTRACHROMOSOMAL NATURE OF DRUG RESISTANCE IN *Staphylococcus aureus*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 182, n. 1, p. 279–294, 1971.
- PALMQVIST, N. et al. Bacterial cell wall-expressed protein A triggers supraclonal B-cell responses upon in vivo infection with *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1501–1511, dez. 2005.
- PAN, H. et al. Prevalence of and risk factors for nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among children in central Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 52, n. 1, p. 45–53, fev. 2019.
- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Spread of *Tst*-Positive *Staphylococcus aureus* Strains Belonging to ST30 Clone among Patients and Healthcare Workers in Two Intensive Care Units. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 270, set. 2017.
- PARDO, L. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 1, p. 10–16, 2013.
- PATERNINA-DE LA OSSA, R. et al. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 371–376, set. 2018.
- PENG, H. et al. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17916, dez. 2018.
- PIRES, F. V. et al. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92537, mar. 2014.
- RAVEN, K. E. et al. Methodology for Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in a Routine Hospital Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, p. e00180-19, mar. 2019.
- RICHARDSON, A. R. Virulence and Metabolism. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1–14, mar. 2019.

RODRIGUES, S. et al. Frequent MRSA nasal colonization among hospitalized children and their parents in Angola and São Tomé and Príncipe. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 3, p. 344–349, nov. 2018.

SAADATIAN-ELAHI, M. et al. Basic Rules of Hygiene Protect Health Care and Lab Workers from Nasal Colonization by *Staphylococcus aureus*: An International Cross-Sectional Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82851, dez. 2013.

SAKOULAS, G. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*-Positive Susceptible Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3946–3951, nov. 2001.

SAKR, A. et al. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–15, out. 2018.

SANTOS, A. L. DOS et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, jun. 2007.

SASSINE, J. et al. Functional redundancy of division specific penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 304–318, out. 2017.

SEPTIMUS, E. J.; SCHWEIZER, M. L. Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 201–222, abr. 2016.

SHETTY, V. et al. Prevalence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization Among Children. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. DC12–DC15, 2014.

SHINEFIELD, H. et al. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 7, p. 491–496, 2002.

SHORE, A. C. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

SMITH, E. C. J. et al. The Phenolic Diterpene Totarol Inhibits Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4480–4483, dez. 2007.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. 1. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

SOLTANI, B. et al. Risk Factors for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization of Healthy Children. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1–6, set. 2014.

- THOMAS, S. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Aboriginal children attending hospital emergency departments in a regional area of New South Wales, Australia: a seven-year descriptive study. **Western Pacific Surveillance and Response Journal**, v. 8, n. 4, p. 6–12, dez. 2017.
- THOMSEN, I. P. et al. Molecular Epidemiology of Invasive *Staphylococcus aureus* Infections and Concordance with Colonization Isolates. **The Journal of Pediatrics**, v. 210, p. 173–177, jul. 2019.
- TIWARI, H. K.; SAPKOTA, D.; SEN, M. R. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (*coa*) gene PCR as the gold standard. **Nepal Medical College journal**, v. 10, n. 2, p. 129–131, jun. 2008.
- TOLEMAN, M. S. et al. Systematic Surveillance Detects Multiple Silent Introductions and Household Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in the East of England. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 3, p. 447–453, ago. 2016.
- TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.
- TRAUTMANN, M. et al. The Use of Mupirocin in the Preoperative Eradication of *Staphylococcus aureus*. **Deutsches Arzteblatt**, v. 104, n. 47, p. 3259–3265, 2007.
- TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, abr. 2019.
- UHLEMANN, A.-C. et al. Molecular tracing of the emergence, diversification, and transmission of *S. aureus* sequence type 8 in a New York community. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 18, p. 6738–6743, maio 2014.
- WANG, X. et al. Molecular Characteristics of Community-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates From Pediatric Patients With Bloodstream Infections Between 2012 and 2017 in Shanghai, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. June, p. 1–9, jun. 2018.
- WATANABE, S. et al. Genetic Diversity of Staphylocoagulase Genes (*coa*): Insight into the Evolution of Variable Chromosomal Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5714, 2009.
- WONG, J. W. H. et al. Prevalence and risk factors of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in Asia-Pacific region from 2000 to 2016: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Epidemiology**, v. 10, p. 1489–1501, 2018.
- WU, Z. et al. Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7597–7601, dez. 2015.

YAN, M. et al. Nasal Microenvironments and Interspecific Interactions Influence Nasal Microbiota Complexity and *S. aureus* Carriage. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 6, p. 631–640, dez. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Criança

“Colonização por *Staphylococcus aureus* comunitário no binômio mãe-criança”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidar a criança ou adolescente sob sua responsabilidade para participar da pesquisa “Colonização por *Staphylococcus aureus* no binômio mãe-criança” a ser realizada no pronto socorro pediátrico do Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar crianças e mães portadoras da bactéria *Staphylococcus aureus*. A participação da criança ou adolescente é muito importante e ela se daria da seguinte forma: seria realizada a coleta de secreção da parte superficial da boca, nariz, axilas e virilhas utilizando um cotonete. Esclarecemos que a participação da criança ou do adolescente é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a) solicitar a recusa ou desistência da participação da criança ou do adolescente a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à criança ou adolescente. Esclarecemos, também, que as informações da criança ou do adolescente sob sua responsabilidade serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa (ou para esta e futuras pesquisas) e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a identidade da criança ou do adolescente.

Os materiais utilizados para coleta de dados serão armazenados por 5 (cinco) anos, após descartados, conforme preconizado pela Resolução CNS 347/05.

Esclarecemos ainda, que nem o(a) senhor(a) e nem a criança ou adolescente sob sua responsabilidade pagarão ou serão remunerados (as) pela participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente da participação.

Os benefícios esperados são: detectar crianças saudáveis portadoras de *Staphylococcus aureus* e identificar as características dessa bactéria.

Essa pesquisa oferecerá riscos mínimos às crianças participantes, pois não utilizará procedimentos dolorosos, somente um leve desconforto pela introdução do cotonete no nariz.

Informamos que esta pesquisa atende e respeita os direitos previstos no Estatuto da Criança e do Adolescente - ECA, Lei Federal nº 8069 de 13 de julho de 1990, sendo eles: à vida, à saúde, à alimentação, à educação, ao

esporte, ao lazer, à profissionalização, à cultura, à dignidade, ao respeito, à liberdade e à convivência familiar e comunitária. Garantimos também que será atendido o Artigo 18 do ECA: "É dever de todos velar pela dignidade da criança e do adolescente, pondo-os a salvo de qualquer tratamento desumano, violento, aterrorizante, vexatório ou constrangedorll.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (Profº(a) Dra Jaqueline Dario Capobiango, Av. Robert Koch, nº 60, V. Operária, tel: (43) 98415-66-42, e-mail: jaquedc@sercomtel.com.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao(à) senhor(a) .

Londrina, _____ de _____ de 2019.

Profº(a) Dra. Jaqueline Dario Capobiango

RG: 4358935-0

_____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo com a participação **voluntária** da criança ou do adolescente sob minha responsabilidade na pesquisa descrita acima.

Assinatura: _____

Data: _____

APENDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Mãe

“Colonização por *Staphylococcus aureus* comunitário no binômio mãe- criança”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa “Colonização por *Staphylococcus aureus* no binômio mãe-criança”, a ser realizada no pronto socorro pediátrico do Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar mães e crianças portadoras com da bactéria *Staphylococcus aureus*”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: seria realizada a coleta de secreção da parte superficial da boca, nariz, axilas e virilhas utilizando um cotonete. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas para esta e futuras pesquisas, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os materiais utilizados para coleta de dados serão armazenados por 5 (cinco) anos, após descartados, conforme preconizado pela Resolução CNS 347/05.

Esclarecemos ainda, que você não pagará e nem será remunerado (a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são: detectar portadores saudáveis de *Staphylococcus aureus* e identificar as características dessa bactéria.

Essa pesquisa oferecerá riscos mínimos aos seus participantes, pois não utilizará procedimentos dolorosos, somente um leve desconforto pela introdução do cotonete no nariz.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (Prof^o(a) Dra Jaqueline Dario Capobianco, Av. Robert Koch, n° 60, V. Operária, tel: (43) 98415-66-42, e-mail: jaquedc@sercomtel.com.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue à você.

Londrina, ____ de _____ de 2019.

Profº(a) Dra. Jaqueline Dario Capobiango

RG: 4358935-0

_____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE C – Questionário para Coleta de Dados



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

PACIENTE

(CRIANÇA): _____

_____ REGISTRO: _____

SEXO: _____ IDADE: _____ CLÍNICA: _____

SUSPEITA CLÍNICA: _____

PACIENTE

(MÃE): _____

_____ REGISTRO: _____

IDADE: _____ CLÍNICA: _____ SUSPEITA

CLÍNICA: _____

Endereço: _____

_____ Contato: _____

ANAMNESE		
	MÃE	CRIANÇA
Esteve internada nos últimos 6 meses?	() sim () não	() sim () não
O tempo de internação foi maior que 5 dias?	() sim () não	() sim () não
Esteve internada por mais de 48 horas em UTI nos últimos 6 meses?	() sim () não	() sim () não
Fez uso de antibiótico nos últimos 6 meses?	() sim () não	() sim () não
Possui algum membro da família que trabalhe em hospital (residente no domicílio)?	() sim () não	() sim () não
HISTÓRICO CLÍNICO		
	MÃE	CRIANÇA
Doença crônica:	() sim () não	() sim () não

	não	
Medicação de uso contínuo:	() sim () não	() sim () não
Diagnóstico atual:		*
Resultado de exames laboratoriais relevantes:		*
DADOS DA COLETA DE SWAB: RESPONSÁVEL:		
Data: ___/___/_____ Horário: _____		

APÊNDICE D – Instrumento de Análise Fenotípica

DESCRIÇÃO DO MATERIAL: _____

CONSERVAÇÃO: _____ BACTERIOSCOPIA

DIRETA: _____

OBSERVAÇÕES: _____

CRIANÇA (PAB-C) - CULTURA Nº _____					
CULTIVOS	PROVAS BIOQUÍMICAS				
TSB+NaCl 6,5% / / : Após inc. 18/24h 35±2 °C	CATALASE				
	E-TEST®				
MANITOL / / : 24h 48h	TSA		D-TEST:		
		halo	S	I	R
—Colônias duvidosasII (reinoculação) MANITOL / / : 24h 48h	CLINDAMICINA (DA)				
	PENICILINA (P)				
DNase / / : Após inc. 18/24h 35±2 °C	OXACILINA (OX)				
	CEFOXITINA (FOX)				
Screening e TSA / / : OXA6: 24h 48h	CIPROFLOXACINO (CIP)				
	GENTAMICINA (CN)				
VAN3: 24h 48h	TETRACICLINA (TE)				
VAN4: 24h 48h	TIGECICLINA (TGE)				
NaCl 2%: 24h 48h	LINEZOLIDA (LZD)				
CONCLUSÕES:	ERITROMICINA (E)				
	RIFANPICINA (RD)				
	SULFA + TRIM. (SXT)				
	NV= _____ PB= _____				

MÃE (PAB-M) - CULTURA Nº _____					
CULTIVOS	PROVAS BIOQUÍMICAS				
TSB+NaCl 6,5% / / : Após inc. 18/24h 35±2 °C	CATALASE				
	E-TEST®				
MANITOL / / : 24h 48h	TSA		D-TEST:		
		halo	S	I	R
—Colônias duvidosasII (reinoculação) MANITOL / / : 24h 48h	CLINDAMICINA (DA)				
	PENICILINA (P)				

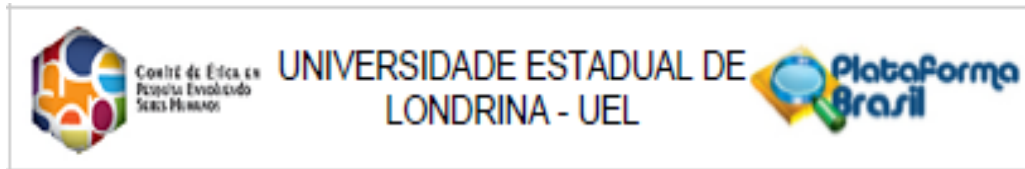
DNase ____ / ____ / ____ : ____	OXACILINA (OX)					
Após inc. 18/24h 35±2 °C _____	CEFOXITINA (FOX)					
Screening e TSA ____ / ____ / ____ : ____	CIPROFLOXACINO (CIP)					
OXA6: 24h _____ 48h _____	GENTAMICINA (CN)					
VAN3: 24h _____ 48h _____	TETRACICLINA (TE)					
VAN4: 24h _____ 48h _____	TIGECICLINA (TGE)					
NaCl 2%: 24h _____ 48h _____	LINEZOLIDA (LZD)					
CONCLUSÕES:	ERITROMICINA (E)					
	RIFAMPICINA (RD)					
	SULFA + TRIM. (SXT)					
	NV= _____ PB= _____					

RESPONSÁVEL PELAS ANÁLISES: _____

ESTOQUE: _____

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Colonização por *Staphylococcus aureus* no binômio mãe-criança

Pesquisador: Jaqueline Dario Capobiango

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 86708018.4.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Pediatria e Cirurgia Pediátrica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.620.864

Apresentação do Projeto:

Estudo prospectivo, transversal, realizado pronto-socorro pediátrico de um hospital universitário do Paraná. O cálculo da amostra foi estimada em 644 pacientes, 322 crianças e 322 mães para uma prevalência de 40% de crianças colonizadas com *S. aureus* na comunidade. Serão incluídas todas as crianças admitidas no pronto-socorro no de 2018. Serão excluídos os seguintes pacientes: recém-nascidos, crianças com história de admissão prévia durante no mínimo 5 dias de internação, nos últimos 6 meses; crianças com história de admissão prévia durante no mínimo 48 horas em UTI, nos últimos 6 meses.

Resumo:

Bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* pertencem ao grupo dos cocos gram-positivos que são frequentemente encontrados na pele e mucosas de pessoas saudáveis, e são responsáveis por provocar doenças, que vão desde uma simples infecção, até infecções graves. Entre as cepas de *S. aureus* os CAMRSA (community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus) tem se tomado um desafio para medicina pediátrica, dadas prevalências aumentadas de infecções nessa população, e as taxas aumentadas

de morbimortalidade. Estudos demonstram o aumento da prevalência de CA-MRSA entre crianças saudáveis. No entanto, os dados sobre colonização nasal por *S. aureus* no Brasil, ainda são escassos. Serão avaliadas, nesse estudo prospectivo, 644 amostras (322 crianças e 322 mães) de secreção nasal de crianças e mães admitidas no Pronto

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA



Conselho de Ética em
Pesquisa envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Protocolo: 2.020.004

Socorro Pediátrico do Hospital Universitário de Londrina durante o ano de 2018. Pacientes recém-nascidos, crianças com história de admissão prévia no mínimo 5 dias de Internação, nos últimos 6 meses; crianças com história de admissão prévia durante no mínimo 48 horas em UTI, nos últimos 6 meses; serão excluídas desse estudo. Os dados coletados serão rotulados e a análise estatística será feita utilizando o programa EPI Info 3.4.3 e o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows, version 20.0; SPSS, Inc.). Esperamos, como conclusão deste projeto, identificar a prevalência de colonização por *S. aureus* em mães e crianças da comunidade local; frequência de resistência de *S. aureus* a oxacilina e determinação da concentração inibitória mínima para vancomicina.

Hipótese:

Temos como hipótese, prevalência estimada de 40% de crianças da comunidade colonizadas por *Staphylococcus aureus*, e a maioria das mães também colonizadas pelo mesmo microrganismo. Estimamos encontrar amostras de *S.aureus* resistente a oxacilina em metade das amostras analisadas.

Metodologia Proposta:

Estudo prospectivo, com a finalidade de avaliar a colonização por *Staphylococcus aureus* em crianças entre 1 mês e 12 anos de idade, admitidas no Pronto Socorro Pediátrico do Hospital Universitário de Londrina (HUL) nas primeiras 48 horas de internação, no período de maio a julho de 2018. Cálculo da amostra: Considerando uma prevalência estimada de 40% de crianças colonizadas por *Staphylococcus aureus* (BRAGA, 2014) e

2500 crianças atendidas por ano do Pronto Socorro Pediátrico, o tamanho estimado da amostra é de 644 pacientes, 322 crianças e 322 mães.

Critério de Inclusão:

Crianças entre 1 mês e 12 anos de idade, admitidas no Pronto Socorro Pediátrico do Hospital Universitário de Londrina (HUL) nas primeiras 48 horas de internação.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos os seguintes pacientes: recém-nascidos; crianças com história de admissão prévia durante no mínimo 5 dias de internação, nos últimos 6 meses; crianças com história de admissão prévia durante no mínimo 48 horas em UTI, nos últimos 6 meses.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência de colonização por *S. aureus* em crianças admitidas no Pronto Socorro Pediátrico do Hospital Universitário de Londrina (HUL).

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

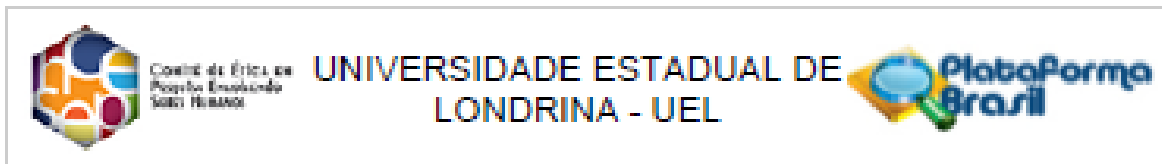
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep088@uel.br



Continuação do Protocolo: 2.620.864

Objetivo Secundário:

Avallar a frequência de mães colonizadas por *Staphylococcus aureus*, cujas crianças também são colonizadas por *Staphylococcus aureus*; Avallar a sensibilidade do *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos; Avallar a prevalência de CA-MRSA em crianças admitidas no Pronto Socorro do HUL;- Determinar os mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus*; Realizar a tipagem do gene mec A; Avallar fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco imposto pela futura pesquisa será mínimo, e está relacionado a um pequeno desconforto que poderá ocorrer no momento em que o swab será introduzido nas narinas.

Benefícios:

Deteção de colonização por *Staphylococcus aureus* em crianças saudáveis e identificação do perfil sensibilidade desse agente. O que pode fornecer dados para posterior terapia empírica em crianças com doenças invasivas por *S. aureus*.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram apresentados:

- Folha de rosto para pesquisa com seres humanos;
- Declarações das unidades coparticipantes;
- Termo de consentimento livre e esclarecido em forma de convite e com linguagem adequada (um para a criança e outro para os responsáveis);
- Termo de Confidencialidade e Sigilo;
- Declaração da unidade coparticipante referente ao armazenamento e uso de material biológico para fins de Banco de Material.

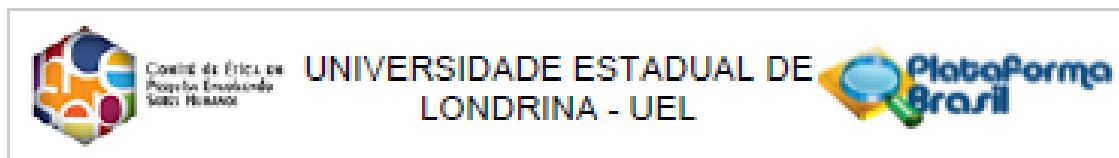
Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências listadas na avaliação anterior (primeira) foram atendidas e, portanto, vota-se pela aprovação do projeto.

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-070
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.620.864

Considerações Finais a critério do CEP:

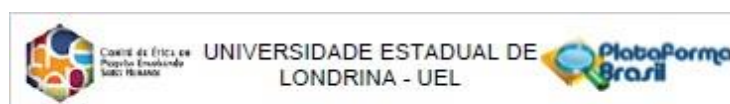
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1065632.pdf	18/04/2018 18:09:48		Acelto
Outros	Termo_pesquisa_crianca_corrigido.pdf	18/04/2018 18:08:39	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Outros	Termo_pesquisa_adulto_corrigido.pdf	18/04/2018 18:06:57	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Outros	Carta_resposta_as_pendencias.pdf	18/04/2018 18:04:29	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_NIPE.pdf	28/03/2018 21:20:51	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_crianca.pdf	28/03/2018 21:19:26	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto.pdf	28/03/2018 21:18:43	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	28/03/2018 21:17:46	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade_e_sigilo.pdf	28/03/2018 21:16:36	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_armazenamento_de_amostras.pdf	28/03/2018 21:14:14	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_Infraestrutura.pdf	28/03/2018 21:10:37	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	28/03/2018 21:04:15	ALEXANDRE GASONATTO	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:



Continuação do Parecer: 2.620.864

Não

LONDRINA, 25 de Abril de 2018

Assinado por:
Rosana Lopes
(Coordenador)