



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ  
Professor Aloísio Teixeira



**GABRIELLE MILÃO CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Staphylococcus aureus* EM CRIANÇAS  
DE UMA PRÉ-ESCOLA DE MACAÉ/RJ**

MACAÉ

2021

C268a

Cardoso, Gabrielle Milão

Avaliação da colonização por *Staphylococcus aureus* em crianças de uma pré-escola de Macaé/RJ. / Gabrielle Milão Cardoso. -- Macaé, 2021.  
65 f.

Orientador: Fernanda Sampaio Cavalcante

Coorientador: Maria Christina dos Santos Verdam

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Farmácia, 2021.

1. *Staphylococcus*. 2. Infecção em crianças. I. Cavalcante, Fernanda Sampaio, orient. II. Verdam, Maria Christina dos Santos, coorient. III. Título.

CDD 579.353

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira  
Bibliotecária Rosângela Ribeiro Magnani Diogo CRB7/3719

**GABRIELLE MILÃO CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Staphylococcus aureus* EM CRIANÇAS  
DE UMA PRÉ-ESCOLA DE MACAÉ/RJ**

Projeto de pesquisa apresentado à banca examinadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como requisito para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Orientadora: Fernanda Sampaio Cavalcante

Co-orientadora: Maria Christina dos Santos Verdam

MACAÉ

2021

Dedico este trabalho aos pais e crianças da Escola Municipal de Educação Infantil – EMEIs André Vinícius de Souza Gonçalves que se dispuseram a colaborar e permitiram a participação dos seus filhos no estudo de forma agradável.

Gabrielle Milão Cardoso

**AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Staphylococcus aureus* EM CRIANÇAS  
DE UMA PRÉ-ESCOLA DE MACAÉ/RJ**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para  
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 07 de maio de 2021.

Comissão avaliadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Sampaio Cavalcante

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4367753122056812>

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tamara Lopes Rocha de Oliveira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

<http://lattes.cnpq.br/5409532880524892>

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gizele Duarte Garcia

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/2680033246192868>

*Disse-lhes Jesus: "Deixai vir a mim estas  
criancinhas e não as impeçais, porque o Reino dos  
Céus é para aqueles que lhes assemelham".*

*Mateus 19:14*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, agradeço primeiramente, pois em todos os momentos se fez presente, através de pessoas que foram colocadas no meu caminho durante essa trajetória e por todas as vezes que eu pude ter a certeza de que não era eu sozinha, mas sim, Deus comigo. A Mãe Santíssima, agradeço por todo amparo e intercessão.

Aos meus queridos pais, Cláudia e Jailson, por todo apoio, amor, por sempre acreditarem em mim, me ensinarem a ir atrás dos meus sonhos e sonharem junto comigo. A minha mãe, de forma especial, pois sempre me inspirou como mulher, guerreira e porque nunca permitiu que desistisse de nada fácil. Amo vocês

A minha prima Bruna, que esteve sempre comigo, me apoiou e sempre me fazia sonhar e pensar positivo, muito obrigada por tudo. Amo você!

Ao meu namorado, João Victor, meu amigo, companheiro de todos os momentos, por me encorajar, apoiar, incentivar, por me acalmar e me fazer respirar fundo, quando não tinha certeza se ia dar certo. Amo você, meu amor!

A toda equipe da Escola André Vinícius de Souza Gonçalves, que abriram as portas, acreditaram, confiaram e colaboraram para o desenvolvimento do estudo.

A Jacy e Mariana do Laboratório de Microbiologia do Pólo Ajuda que muito ajudaram durante o projeto.

A toda equipe do Laboratório de Infecção Hospitalar - CSS, por me auxiliarem nas técnicas e metodologias necessárias para estudo.

A minha orientadora, Fernanda Cavalcante, por acreditar em mim, pela sua disposição em explicar, pela paciência, tranquilidade, didática e por sempre manter a calma, dizendo que tudo estava sob controle e ia dar certo.

A minha co-orientadora, Maria Christina, que permitiu através do projeto de extensão, traçar um projeto ainda maior, onde encontrei uma paixão, esse estudo.

Às crianças e aos seus pais que concordaram em participar do projeto, colaborando com o avanço da pesquisa em Macaé.

A FAPERJ, pelo suporte financeiro que permitiu a execução do trabalho.

Agradeço de coração a todos!

## RESUMO

**Introdução:** *Staphylococcus aureus* é uma espécie bacteriana encontrada normalmente em pele e fossas nasais de pessoas saudáveis e isolada com frequência em infecções comunitárias e naquelas associadas aos cuidados de saúde. A resistência a antibióticos existe desde a introdução da penicilina, mas com o passar das décadas, linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes começaram a ser notadas na comunidade, assim caracterizou-se um novo problema de saúde pública (Braga *et al.*, 2014). Nesse contexto, as crianças que frequentam pré-escolas são um dos principais grupos associados ao carreamento de amostras resistentes. **Objetivos:** Avaliar a colonização por *Staphylococcus spp.* sensíveis e resistentes à meticilina em crianças de uma instituição de ensino pré-escolar de Macaé/RJ, identificar as espécies coagulase negativas, determinar os perfis de susceptibilidade aos antibióticos e apreciar a diversidade clonal e a similaridade genética entre as amostras MRSA. **Materiais e Métodos:** Swabs nasais foram utilizados na coleta de amostra e estes semeados em ágar manitol salgado e a identificação das espécies foi realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Amostras de *S. aureus* foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antibióticos através do teste de difusão de disco (CLSI, 2018). Foi realizada a caracterização do SCCmec nas amostras MRSA e essas também foram submetidas à análise do perfil de fragmentação do DNA. **Resultados e Discussão:** Foram analisadas 45 crianças no estudo, das quais foram isoladas 56 amostras. Três crianças não apresentaram crescimento bacteriano. A espécie mais encontrada entre as amostras foi *S. aureus* (26 amostras; 46,4%), em seguida *S. epidermidis* (12; 21,4%), *S. sciuri* (5; 8,9%) e *S. saprophyticus* (3; 5,4%). Além disso, foram detectadas cinco amostras do gênero *Corynebacterium* (8,9%), uma de *Enterococcus hirae* e um *Bacillus cereus* (1,8% cada). Três (5,4%) amostras não foram passíveis de caracterização pelo MALDI-TOF. Entre 26 *S. aureus*, sete (26,9%) foram resistentes à meticilina (MRSA). Entre as crianças avaliadas 15,5% foi positiva para MRSA, sendo uma (2,22%) do maternal I, duas (4,44%) do maternal II, quatro (8,9%) do Pré II, indicando um aumento da frequência de MRSA diretamente proporcional a idade. Foi detectado elevado percentual de resistência a eritromicina (53%) para amostras *S. aureus* e 75% para amostras SCN. De acordo com o CLSI, todas as amostras demonstraram resistência intermediária a ciprofloxacino e todas as amostras SCN foram sensíveis à gentamicina, tetraciclina, rifampicina e teicoplanina. Nove (34,6%) amostras foram sensíveis a todos antibióticos, cinco (19,23%) amostras foram resistentes a somente um antibiótico, 30,8% (8) foram resistentes a dois antibióticos, 3,8% (1) foram resistentes a três, 11,53% (3) foram resistentes a quatro antibióticos e 3,8% (1) resistente a seis antibióticos. Das amostras *S. aureus*, 5 (71,43%) carreamam SCCmec IV. **Conclusão:** A prevalência de MRSA no estudo foi próxima do relatado na literatura entre crianças brasileiras com predominância do SCCmec IV. Assim, o estudo pode amparar o entendimento da disseminação do patógeno em ambientes pré-escolares e a relevância do uso racional dos antibióticos. **Possíveis Perspectivas:** A realização da avaliação do perfil genotípico das amostras MRSA através da técnica de PFGE.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus*, pré-escola, resistência antimicrobiana



## ABSTRACT

**Introduction:** *Staphylococcus aureus* is a bacterial species commonly found in the skin and nassa of healthy people and often isolated in community infections and those associated with health care. Antibiotic resistance has existed since the introduction of penicillin, but over the decades, resistant *Staphylococcus aureus* strains began to be noticed in the community, thus characterizing a new public health problem (Braga *et al.*, 2014). In this context, children who attend preschools are one of the main groups associated with the collection of resistant samples. **Objectives:** To evaluate colonization by *Staphylococcus* spp. sensitive and resistant to methicillin in children from a preschool institution in Macaé/RJ, identify coagulase-negative species, determine antibiotic susceptibility profiles and appreciate clonal diversity and genetic similarity among MRSA samples. **Materials and Methods:** Nose swabs were used in the sample collection and these were sown in salted mannitol agar and species identification was performed by mass spectrometry (MALDI-TOF). Samples of *S. aureus* were evaluated for antibiotic susceptibility through the disk diffusion test (CLSI, 2018). *SCCmec* was characterized in MRSA samples and they were also submitted to DNA fragmentation profile analysis. **Results and Discussion:** Forty-five children were analyzed in the study, from whom 56 samples were isolated. Three children did not present bacterial growth. The species most commonly found among the samples was *S. aureus* (26 samples; 46.4%), followed by *S. epidermidis* (12; 21.4%), *S. sciuri* (5; 8.9%) and *S. saprophyticus* (3; 5.4%). In addition, five samples of the genus *Corynebacterium* (8.9%), one of *Enterococcus hirae* and one *Bacillus cereus* (1.8% each) were detected. Three (5.4%) samples were not becharacterized by MALDI-TOF. Among 26 *S. aureus*, seven (26.9%) resistant to mespicillin (MRSA). Among the children evaluated, 15.5% were positive for MRSA, one (2.22%) of maternal I, two (4.44%) of maternal II, four (8.9%) indicating an increase in the frequency of MRSA directly proportional to age. A high percentage of erythromycin resistance (53%) samples *S. aureus* and 75% for SCN samples. According to CLSI, all samples demonstrated intermediate resistance to ciprofloxacin and all CnS samples were sensitive to gentamicin, tetracycline, rifampicin and teicoplanin. Nine (34.6%) samples were sensitive to all antibiotics, five (19.23%) samples were resistant to only one antibiotic, 30.8% (8) were resistant to two antibiotics, 3.8% (1) were resistant to three, 11.53% (3) were resistant to four antibiotics and 3.8% (1) resistant to six antibiotics. Of the *S. aureus* samples, 5 (71.43%) *SCCmec* IV. **Conclusion:** The prevalence of MRSA in the study was close to that reported in the literature among Brazilian children with predominance of *SCCmec* IV. Thus, the study can help to understand the spread of the pathogen in preschool environments and the relevance of rational use of antibiotics. **Possible Perspectives:** The evaluation of the genotypic profile of MRSA samples through the PFGE technique.

**Keywords:** *Staphylococcus*, preschool, antimicrobial resistance

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

Figura 1.....Localização da Escola André Vinícius de Souza Gonçalves no Município de Macaé. Adaptado: Google Maps.

Figura 2.....Representação da técnica de MALDI-TOF. Adaptado de: Croxatto, A., G. Prod'homme, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev, 2012. 36(2): p. 380-407.

Figura 3.....Disposição do Antibiograma para o Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA).

Figura 4.....Amostras semeadas em ágar Manitol Salgado com crescimento bacteriano e presença de fermentação.

Figura 5.....Imagem A e B - amostras sugestivas de *Staphylococcus* através da coloração de Gram.

Figura 6.....Amostra bacteriana submetida ao teste de susceptibilidade aos antibióticos.

Figura 7.....Teste D positivo com achatamento do halo entre eritromicina e clindamicina.

Figura 8.....Eletroforese em gel para detecção do SCCmec após PCR.

Figura 9.....Técnica padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas. PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) foi utilizada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados.

Tabela 1..... Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do SCCmec.

Tabela 2..... Avaliação da co-colonização nas crianças que apresentavam mais de uma espécie bacteriana.

Tabela 3..... Avaliação do perfil de susceptibilidade e multirresistência das amostras *S. aureus*.

Tabela 4..... Perfil de dados sobre as crianças avaliadas

Quadro 1. Classificação com base nos scores oriundos da técnica MALDI-TOFF.

Gráfico 1..... Distribuição das crianças analisadas por sexo.

Gráfico 2..... Percentual de crianças em classes escolares da Escola André Vinícius de Souza Gonçalves.

Gráfico 3..... Distribuição das espécies bacterianas identificadas e confirmadas pela técnica de MALDI-TOF.

Gráfico 4..... Perfil de resistência plena das 26 amostras de *S. aureus* frente aos antibióticos testados, segundo os critérios do BrCAST e CLSI.

Gráfico 5..... Perfil de resistência intermediária das 26 amostras de *S. aureus* frente aos antibióticos testados, segundo os critérios do BrCAST e CLSI.

Gráfico 6..... Perfil de resistência das amostras SCN.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CA-MRSA: Community-associated *Staphylococcus aureus* (associado à comunidade)

HA-MRSA: Healthcare-associated *Staphylococcus aureus* (associado à assistência à saúde)

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilicina

ccr: Cassete Chromosome Recombinases

ATCC: American Type Culture Collection

PCR: Polymerase chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

PVL: Panton-Valentine Leukocidin

SCCmec: *Staphylococcal* Chromosome Cassete *mec*

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a Vancomicina

TSA: Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

BrCAST: Comitê brasileiro, reconhecido oficialmente pelo EUCAST como um comitê nacional.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (comitê europeu).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	13
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.2. RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.3. DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.4. DOENÇAS INFECCIOSAS E AMBIENTE ESCOLAR	18
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	20
<b>4. OBJETIVOS</b>	21
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	22
5.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA	22
<b>5.1.1. Coleta de Swab Nasal</b>	23
5.2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	23
<b>5.2.1. Amostras bacterianas</b>	23
<b>5.2.2. Identificação do gênero <i>Staphylococcus</i></b>	24
<b>5.2.3. Aspecto Morfotintorial</b>	24
5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS	24
<b>5.3.1. Identificação da espécie <i>Staphylococcus aureus</i> através da espectrometria de massas</b>	24
5.4. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À METICILINA E OUTROS ANTIBIÓTICOS	26
5.5. EXTRAÇÃO DO DNA POR <i>Chelex-100</i> E PROTEINASE K	28
5.6. CARACTERIZAÇÃO DO SCC <i>mec</i> por PCR	28
5.7. COLETA DE DADOS ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO	30
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	31
6.1. PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	31
6.2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	32
6.3. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	36
6.4. PREVALÊNCIA DE MRSA EM CRIANÇAS NAS AMOSTRAS DE <i>Staphylococcus</i>	44
6.5. AVALIAÇÃO DO SCC <i>mec</i> ATRAVÉS DO PCR	46
6.6. DADOS DAS CRIANÇAS PRESENTE NOS ESTUDOS	48
<b>7. CONCLUSÕES</b>	50
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	51
<b>9. ANEXOS</b>	58
9.1. ANEXO 1	58
9.2. ANEXO 2	61
9.3. ANEXO 3	62

## 1. INTRODUÇÃO

Há algum tempo, a sociedade vem sofrendo constante mudança, especialmente no que se refere a entrada da mulher no mercado de trabalho. Assim, houve a necessidade de buscar cuidados extralares, como creches e pré-escolas, integrais ou não, públicas ou privadas, para que pudessem deixar seu(s) filho(s) sob um cuidado, enquanto essas mulheres dedicavam o tempo ao trabalho. No Brasil, o acesso à creche aumentou, em 1991, 38% das crianças na faixa etária de cinco a seis anos frequentavam creches, e em 2000, era de 72% (PEREIRA *et al.*, 2010). Portanto, a quantidade de crianças sendo cuidadas por cuidadoras de forma coletiva, principalmente em creches vem aumentando ao longo dos anos, por conta de alguma necessidade familiar ou por uma condição socioeconômica (PEDRAZA D F *et al.*, 2012). Esses ambientes podem ser considerados ideais para que essas crianças sejam portadoras e/ou transmissoras de patógenos, pelo fato do contato próximo e íntimo, ou por ainda não ter ciência dos hábitos básicos de higiene. Deste modo, tivemos um aumento no risco dos desenvolvimentos de diferentes infecções, além da disseminação e da transmissão de doenças entre as crianças, familiares, irmãos e cuidadores (NESTI & GOLDBAUM, 2007).

Dentre a disseminação e colonização de patógenos, a colonização do *S. aureus* sem sinais clínicos é um fator importante para carreamento do microrganismo, sendo uma propriedade biológica dele, que tem assim um fator de risco para o desenvolvimento de infecções por *S. aureus* tanto na comunidade como nos hospitais.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

Esta bactéria faz parte do gênero *Staphylococcus*, o qual possui espécies coagulase negativos (SCN) e coagulases positivos. A espécie *S. aureus* é a mais importante do gênero e faz parte do grupo dos coagulase positivos. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que possui a sua forma básica em cocos e pode apresentar-se de diferentes formas. Comumente é encontrado na forma de cachos agrupados, mas pode aparecer de forma isolada, em pares ou cadeias curtas. Possui aproximadamente cerca de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, a coloração das colônias é normalmente amarelo-ouro, são imóveis, positivos para a enzima catalase, não formam esporos e são anaeróbios facultativos. Além disso, *S. aureus* possui um crescimento ideal em 35°C (mesófilas) em média com 24 a 48 horas de incubação e uma faixa de pH considerada adequada entre 4,0 e 9,6, sendo o pH ótimo igual a 7,0 (BAIRD PARKER et al., 1990). A espécie *S. aureus* faz parte da microbiota humana, e é encontrada na pele e nas narinas anteriores, onde é o sítio mais frequente de colonização (KLUYTMANS et al., 1997; KLUYTMANS & WERTHEIM, 2005). Por outro lado, as espécies coagulase negativas fazem parte da microbiota anfibiônica dos seres humanos, sendo algumas espécies encontradas em todo o corpo (JAMALUDIN et al, 2008; GRICE & SEGRE, 2011). As principais SCN encontradas são em geral *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. auriculares*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Dessa forma, a maioria das espécies são classificadas como colonizadoras sem presença de algum sinal clínico, sendo consideradas oportunistas e, apenas em algumas situações, elas se tornam patogênicas (OTTO, 2004; CUNHA et al, 2002).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno causador de infecções graves, tanto relacionado no acesso ao cuidado em saúde (HA) quanto na comunidade (CA) (ARALI et al., 2015, FRAZEE et al., 2005; JERASSY et al., 2006). Por estar presente em diversas regiões da pele e nas mucosas, a maioria das infecções causadas por *S. aureus* é de natureza superficial e atinge a derme e tecidos subjacentes. Além disso, vários estudos relatam *S. aureus* como a espécie mais isolada em infecções de pele (ZILBERBERG et al., 2010; FORCADE et al., 2011). Entretanto, esse patógeno é também frequentemente associado a infecções invasivas graves, como:

endocardites, infecções da corrente sanguínea, inclusive aquelas associadas a dispositivos vasculares, osteomielites e meningites, assim como infecções cutâneas graves, como fascite necrosante (COOKE & BROWN, 2010) e pneumonias associadas à ventilação mecânica (GUPTA *et al.*, 2011).

Cerca de 20% dos indivíduos possuem colonização persistente e 30% de forma intermitente, ou seja, acredita-se que quase um em cada três pessoas saudáveis carregam *S. aureus* de forma assintomática sem qualquer quadro clínico associado. Outrossim, a versatilidade do microrganismo e a capacidade de adaptação a diversos ambientes, facilita a colonização para outras pessoas (WERTHEIM *et al.*, 2005).

## 2.2 RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

A patogenicidade de *S. aureus* é um processo que envolve uma grande quantidade de componentes extracelulares e da parede celular, além do mais, é complexa, pois depende de fatores como: a virulência do microrganismo, a resistência antimicrobiana e a susceptibilidade do hospedeiro (BHATTA *et al.*, 2016). O *Staphylococcus aureus* pode expressar mais de 20 proteínas de superfície que permanecem ligadas à membrana plasmática (ROCHE *et al.*, 2003), além de uma gama de adesinas que são secretadas no meio extracelular e essas ligam-se à matriz do hospedeiro. Estudos afirmam que o processo de adesão às superfícies é um dos principais pontos relacionado a infecção por *Staphylococcus*. Estas adesinas atuam principalmente sobre componentes solúveis do plasma (CHAVAKIS *et al.*, 2005). Além destas proteínas, existem as citolisinas, que são proteínas que causam danos à membrana plasmática das células do hospedeiro, frequentemente levando à sua ruptura. Esse grupo engloba dois grandes subtipos: as esfingomielinases, composto pela  $\beta$ -hemolisina e as modulinas solúveis em fenol (PSM), e as toxinas formadoras de poro com atividade citolítica, onde se encontram a alfa, beta e delta hemolisinas e a Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), sendo esta encontrada principalmente em CA-MRSA (VANDENESCH, LINA & HENRY, 2012).

As hemolisinas possuem atividade citotóxica para os eritrócitos e leucócitos, provocando lise. As espécies de *S. aureus* também frequentemente produzem superantígenos (SAGs). Segundo Stach, Herrera & Schlievert (2014), todas as amostras de *S. aureus* isoladas de infecção produzem ao menos um tipo de SAG.



Uma toxina desse tipo é capaz de ativar mais de 50% dos linfócitos T do hospedeiro, enquanto um antígeno convencional consegue ativar somente 1 a cada 10 mil linfócitos (STACH, HERRERA & SCHLIEVERT, 2014). A intensa ativação de linfócitos provoca uma liberação exagerada de citocinas, que é responsável pelos quadros de choque tóxico.

A grande parte da população colonizada é de assintomáticos, porém o processo sintomático da infecção pode estar associado a fatores como: diminuição da resposta imunológica, procedimentos médicos invasivos e doenças de base (GORDAN & LOWY, 2008).

O alto potencial de patogenicidade de *S. aureus* e as inúmeras infecções causadas por essa espécie levou a uma intensa busca por tratamentos ao longo da história. Em 1928, de forma acidental, Alexander Fleming reportou a descoberta da penicilina, derivada do fungo *Penicillium*, e somente em 1940, deu-se início a utilização deste antibiótico para o tratamento de infecções estafilocócicas. Porém, pouco tempo depois já foram detectadas as primeiras amostras que não apresentavam mais susceptibilidade a este antibiótico, principalmente devido a ação das beta-lactamases, enzima que ocasiona a clivagem do antibiótico (LOWY, 2003).

Sendo assim, no final da década de 1960 foi introduzido o uso das penicilinas semissintéticas (oxacilina e metilicina) após o isolamento do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Essa molécula sofreu alterações na cadeia do precursor da penicilina resultando numa proteção do anel beta-lactâmico contra a ação hidrolítica das beta-lactamases (MIMICA & MENDES, 2007). Porém, logo após surgiram cepas resistentes. Assim, foram descritas as amostras resistentes a esse tratamento, classificadas como *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) e as amostras sensíveis à metilicina (MSSA) (ENRIGHT *et al.*, 2002).

Os antibióticos beta-lactâmicos tem como mecanismo de ação a ligação às proteínas que participam da síntese da parede celular, que são as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Essa ligação inibe as ligações cruzadas, tendo assim impedida a formação da parede celular, o que leva à lise bacteriana. A resistência às penicilinas semissintéticas em *S. aureus* está associada ao desenvolvimento de PBP2a, que está codificada no gene denominado *mecA*. A PBP2A é totalmente funcional, porém possui

baixa afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos. O gene *mecA* é conduzido através do elemento móvel *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) (KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000).

Apesar do *S. aureus* ser um dos principais microrganismos isolados e associados a infecções hospitalares (HA-MRSA), também é muito encontrado colonizando pele e mucosa de pessoas saudáveis na comunidade (CA-MRSA). Amostras HA-MRSA geralmente carregam SCC*mec* dos tipos I, II e III, os tipos IV e V estão mais associadas às amostras CA-MRSA. Os genes são determinados de acordo com o tamanho dos elementos genéticos e pela mobilidade, onde os tipos I, II e III carregam mais genes de resistência, do que os IV e V, que são elementos com mais mobilidade e menores do que os outros (GELLATI *et al.*, 2009).

A resistência a esta droga que foi observada inicialmente em ambientes hospitalares, teve espaço na comunidade pouco depois, onde já não era mais possível distinguir a origem inicial da infecção. Começaram assim relatos sobre a colonização por MRSA em indivíduos sem história de hospitalização ou doenças crônicas. As cepas identificadas nestes grupos foram denominadas CA-MRSA (“community-acquired MRSA”) e foram identificadas em diversas populações, entre elas, crianças que frequentavam creches (BRAGA *et al.*, 2014). Estas por sua vez, apresentam alta prevalência de carreamento de *S. aureus*, já relatada em diversos estudos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; REVEG -YOCHAY *et al.*, 2009; LEBON *et al.*, 2010).

O uso indiscriminado de antibióticos, seja por conta própria, seja por conta dos prescritores, mostra grande influência sobre o crescimento de resistência bacteriana em crianças. Isso se deve à falta de recursos ou por conta da demanda de tempo para um exame conclusivo de diagnóstico, levando assim, ao prescritor a busca de uma tentativa de rápida melhora por meio de antibióticos. A grande parte de infecções tratadas na primeira infância são virais e não bacterianas. Porém, existe a dificuldade de mudança de pensamento, pois a melhora do paciente justifica o uso, na maioria das vezes (ZIMERMAN R. A., 2012).

Mediante a esse uso indiscriminado e com o crescimento de amostras resistentes, passaram a ser utilizados outros antibióticos, a tetraciclina,

sulfametoxazol/trimetoprim, fluorquinolonas e clindamicina para infecções estafilocócicas por CA-MRSA. Para as amostras HA-MRSA são usualmente utilizados a linezolida, tigeciclina, daptomicina, teicoplanina, vancomicina e as cefalosporinas de quinta geração, como a ceftarolina e ceftobiprole (GELLATI *et al.*, 2009, GABRIEL L. R. L., 2018). No entanto, o uso dessas drogas está selecionando cepas resistentes ao longo dos anos. Um dos principais glicopeptídeos utilizados nas infecções estafilocócicas graves é a vancomicina, entretanto, em 1996 foi descoberto uma amostra no Japão que tinha susceptibilidade reduzida, sendo classificada por VISA (*S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina). Anos mais tarde, foi identificado nos Estados Unidos uma amostra de *Staphylococcus aureus* plenamente resistente à vancomicina (VRSA), tendo assim, importância para fins da clínica e da epidemiologia (MIMICA & MENDES, 2007). Além disso, um antibiótico utilizado frequentemente para infecções estafilocócicas em pele e tecidos é a clindamicina, por ter boa penetrabilidade. Entretanto, há a ressalva sobre resistência induzida à clindamicina, podendo ter um antibiograma com uma resistência à eritromicina e falsa sensibilidade à clindamicina, classificado como Fenômeno D (GELLATI *et al.*, 2009).

### 2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Staphylococcus aureus*

Ao longo do tempo, foi possível perceber a necessidade de analisar as amostras de forma fenotípica e genotípica para melhor identificar o perfil de resistência e a similaridade genética de amostras de *Staphylococcus spp.*, sendo importante para determinar a prevalência desses patógenos e melhor propor estratégias eficazes para controle de disseminação (NEVES *et al.*, 2010).

Para auxiliar esse processo de estudo, a aplicação de técnicas de tipagem molecular como a eletroforese em gel de campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis”, PFGE) e o sequenciamento de multilocus enzimáticos (“multi-locus sequence typing”, MLST) foram importantes para caracterização de amostras. A técnica MLST, utiliza-se de sete genes essenciais (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *tpi*, *yqiL* e *pta*) que codificam enzimas para manutenção celular, e posteriormente sofrem amplificação através da reação em cadeia polimerase (PCR), gerando uma sequência. Esta caracteriza-se por um novo alelo, que combinados formam a *sequence type* (ST – perfil de alelos) (ENRIGHT *et al.*, 2000).

As ST parecidas são associadas ao mesmo complexo clonal. Logo, os resultados obtidos são utilizados para um banco de dados, permitindo relacionar as amostras *S. aureus* de vários países e relacionar diferentes estudos. Já a técnica PFGE, é uma das mais utilizadas para estudo epidemiológico de MRSA, pela sua alta capacidade de diferenciar as linhagens de *S. aureus*, apesar disso possui algumas limitações, pelo fato de apresentar dificuldade de comparar resultados com diferentes laboratórios e por possibilitar desordem em relação genética dos clones de MRSA. Embora ambas apresentem benefícios, elas envolvem altos custos e grande demanda de trabalho (TENOVER et al., 1995, ENRIGHT *et al.*, 2000, MCDUGAL *et al.*, 2003)

Portanto, existe grande importância relacionada a esse sequenciamento das amostras para percepção da alteração do perfil de *SCCmec* antes encontrado somente em um ambiente característico (DE MIRANDA *et al.*, 2007)

#### 2.4 DOENÇAS INFECCIOSAS E AMBIENTE ESCOLAR

Crianças saudáveis vem sendo o alvo das infecções por CA-MRSA, principalmente nas últimas décadas. A colonização por MRSA em crianças também permite que elas sejam reservatórias desses patógenos, mesmo sem apresentar nenhum sintoma clínico (TAVARES *et al.*, 2010).

Dessa forma, crianças saudáveis que frequentam creches correm mais riscos de terem uma variedade de infecções, dentre elas, as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, do que crianças que não frequentam creches. Isto ocorre porque elas apresentam hábitos que facilitam a disseminação de patógenos, por conta do contato próximo entre outras crianças e cuidadores/as, e outras, como: a frequente prática de levar as mãos a boca, olhos e nariz, o compartilhamento de brinquedos, a falta do entendimento da correta lavagem das mãos e por possuírem sistema imunológico em processo de maturação (BRAGA *et al.*, 2014, ELSTON D. M., 2007, NESTI & GOLDBAUM, 2007).

As creches e instituições pré-escolares são locais associados à propagação de espécies patogênicas em crianças, por se tratar de um ambiente onde as crianças necessitam de uma atenção, quase que total, por um corpo assistencial coletivo (NESTI & GOLDBAUM, 2007). Assim, pré-escolares podem apresentar colonização

nasal por diferentes microrganismos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus* (JOURDAIN et al., 2011; PAN et al., 2016). É importante ressaltar que crianças colonizadas por esses microrganismos possuem maiores riscos de infecções associadas à pele e ao trato respiratório. Além disso, pode ocorrer disseminação dessas cepas entre crianças e cuidadores/professores (LAMARO-CARDOSO et al., 2009; BONFIM et al., 2011; GERHARDTS et al., 2015).

As infecções respiratórias, como a pneumonia, são uma das principais causas de morte em crianças com menos de 5 anos, especialmente em países em desenvolvimento. Além disso, a otite média, outra infecção que acomete crianças na faixa etária de 3 anos de idade, ainda com o tratamento correto pode acometer desenvolvimento relacionado ao aprendizado, sendo necessário o cuidado com a criança para evitar possíveis problemas futuros (NESTI & GOLDBAUM, 2007). O risco associado à aquisição dessas infecções é de duas até três vezes maior em crianças que frequentam creches, mesmo sendo assintomáticas (NESTI & GOLDBAUM, 2007).

Dessa forma, esses ambientes são facilitadores da disseminação de patógenos, principalmente os causadores de infecções respiratórias e cutâneas, que são encontrados colonizando essas crianças (TAVARES et al., 2010). Por trás desta colonização, além dos já citados, outros fatores podem ser associados, como o acesso ao cuidado em saúde, idade, internações frequentes, infecções recorrentes, o uso indiscriminado de antibióticos, grau de instrução e relações socioeconômicas (BRAGA et al., 2014). Tomar ciência da prevalência e da epidemiologia acerca da colonização por patógenos, em especial por *S. aureus*, incluindo por cepas resistentes à metilina (MRSA) em crianças que frequentam creches é valioso, para melhor executar aplicabilidade de medidas de prevenção e de disseminação bacteriana no ambiente hospitalar e comunitário. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar a prevalência da colonização nasal por *Staphylococcus* em crianças que frequentam creches.

### 3. JUSTIFICATIVA

*Staphylococcus aureus* é um importante patógeno associado às infecções superficiais e invasivas. A disseminação do microrganismo e a presença de linhagens de *S. aureus* resistentes/multirresistentes emergiram na comunidade, gerando um problema de saúde pública. Dentre os principais grupos associados ao carreamento de amostras resistentes, especialmente *S. aureus*, estão as crianças que frequentam creches ou pré-escolas, ambiente considerado favorável para disseminação de tal.

Além disso, *S. aureus* é um dos mais frequentes patógenos identificados em infecções de pele e do trato respiratório inferior em crianças e adultos, sendo considerada a causa de morbidades e óbitos, de infecções cutâneas leves até infecções sistêmicas. Ainda assim, existem poucos estudos sobre a prevalência desses microrganismos colonizando crianças no Brasil, e nenhum no Norte Fluminense. Assim, o presente estudo pode auxiliar no reconhecimento do perfil de colonização e na identificação de tratamentos potencialmente eficazes, bem como compreender a dinâmica da disseminação de *S. aureus* na comunidade.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar a colonização por *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à metilicina em crianças de dois a seis anos completos matriculadas em uma instituição de ensino pré-escolar de Macaé, no estado do Rio de Janeiro, através de um estudo seccional.

### Objetivos específicos

- Avaliar a colonização por amostras de *Staphylococcus spp.* em narina anterior, por meio do cultivo bacteriano em ágar seletivo;
- Identificar as espécies pelo uso da técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF);
- Determinar os perfis de susceptibilidade aos antibióticos, em geral, incluindo a resistência à metilicina por meio do teste de difusão a partir do disco;
- Analisar o tipo de SCCmec presente nas amostras MRSA, por meio de PCR.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E TAMANHO DA AMOSTRA

Foi realizado um estudo seccional e prospectivo para avaliar crianças de dois anos a seis anos de idade matriculadas na Educação Infantil, sobre a ocorrência de colonização nasal por *Staphylococcus aureus* e por amostras MRSA nesta população. A creche/escola selecionada foi a Escola Municipal de Educação Infantil – EMEI André Vinicius de Souza Gonçalves, que possui cerca de 180 crianças e fica localizada no bairro São Marcos, na zona urbana de Macaé. O estudo realizou-se entre maio de 2018 a março de 2020 em Macaé, município da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, região que conta com 206.728 habitantes (IBGE, censo 2010) e está localizado a aproximadamente 170 km do município do Rio de Janeiro. O estudo foi aprovado de acordo com o estabelecido na Resolução nº 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988 (artigos 122 e 130) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Janeiro - Campus Macaé (processo nº 2.435.407).

Figura1. Localização da Escola André Vinicius de Souza Gonçalves no Município de Macaé.



Fonte: Adaptado do Google Maps.



O termo de consentimento livre e esclarecido (vide Anexo 1) foi assinado pelos pais e responsáveis das crianças que estavam aptas a participarem do presente estudo.

A população alvo do estudo foi composta por criança que se enquadraram nos seguintes critérios de inclusão: ter o termo de consentimento livre e esclarecido assinado, ter entre 2 e 6 anos completos, serem regularmente matriculadas na instituição pré-escolar participante do estudo e consentir com a coleta do swab. A amostragem foi feita de forma dividida entre classes, pré-escolar 1 e pré-escolar 2, e depois maternal 1 e maternal 2.

### 5.1.2 COLETA DE SWAB NASAL

A coleta do espécime clínico das crianças ocorreu nos dias de aula, durante o intervalo normalmente estabelecido pela direção da escola, sendo realizadas com auxílio de um swab (haste plástica com ponta de algodão) por criança, previamente umedecido em salina esterilizada e levemente friccionado com movimentos rotatórios na região anterior de ambas as narinas. Era conhecida a possibilidade do possível crescimento de mais de um tipo de colônia, mas somente um swab foi coletado por criança. O procedimento foi realizado sob a supervisão da professora responsável pelas turmas. Foram coletadas em média 18 crianças ao dia, sendo o primeiro dia as crianças das turmas de Pré-escolar 1 e 2, na segunda visita o maternal 1 e 2, e na última visita os alunos que não estavam presentes nos dias que foram feitas as coletas.

Ao final das coletas, os espécimes clínicos foram transportados em meio de cultura de transporte (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e armazenado em isopor devidamente vedado para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé - Pólo Ajuda, para o cultivo inicial em meio seletivo de ágar manitol salgado (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) à 37 °C, em atmosfera de aerobiose e após, foi realizado testes fenotípicos.

Todos os meios de cultura utilizados durante a metodologia, foram esterilizados e confirmado pelo teste de esterilidade.

## 5.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

### 5.2.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

O cultivo inicial foi realizado em meio seletivo ágar manitol salgado, meio seletivo para *S. aureus*. O meio de cultura tem coloração avermelhada, podendo haver mudança para amarelada, caso a espécie seja fermentadora. As amostras bacterianas foram armazenadas em caldo TSB (“Trypticase Soy Broth”, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 20% (v/v) de glicerol, a -20° C.

### 5.2.2 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *Staphylococcus*

As amostras que apresentaram crescimento no ágar manitol salgado foram cultivadas em ágar sangue (Plast Labor, Rio de Janeiro, Brasil) e avaliadas para confirmação do gênero *Staphylococcus*. Os testes para a caracterização do gênero foram realizados de acordo com as metodologias descritas por Bannerman & Peacock (2007), como serão descritos a seguir.

### 5.2.3 ASPECTO MORFOTINTORIAL

O aspecto morfotintorial foi analisado através da coloração de Gram. A leitura foi realizada observando-se a coloração, a morfologia e o arranjo das células bacterianas. As células coradas em violeta foram consideradas Gram positivas, enquanto aquelas coradas em rosa foram consideradas Gram negativas. A amostra de *S. aureus* 12600 foi utilizada como controle Gram positivo.

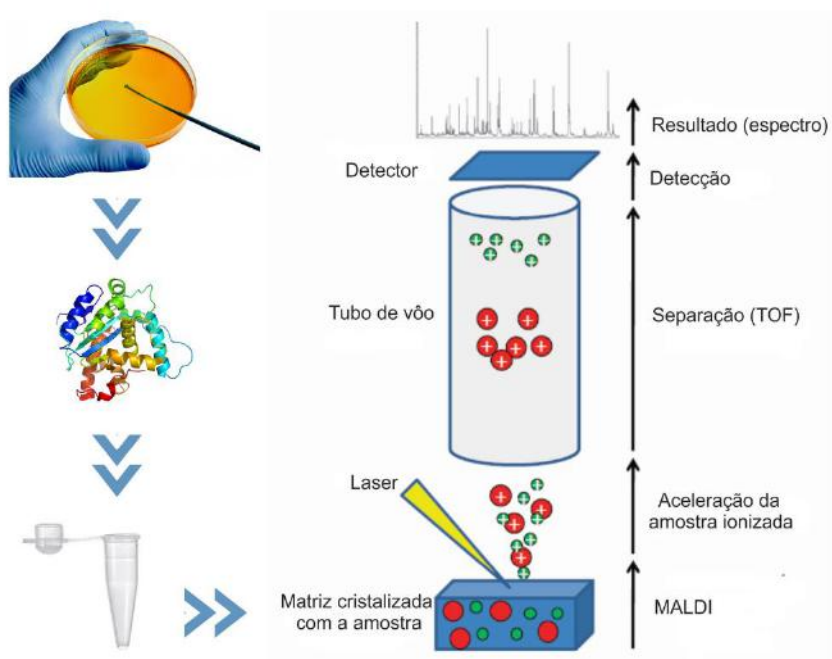
## 5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS

### 5.3.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE *Staphylococcus aureus* ATRAVÉS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A identificação das amostras isoladas foi realizada através da análise do perfil de proteínas celulares utilizando a espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF-MS confirmando a espécie bacteriana. E assim, foi realizada uma extração de proteínas totais de cada isolado bacteriano previamente cultivado em Ágar Mueller-Hinton (Himedia®), a 37°C, em aerobiose, por 24h. Uma alíquota de cada isolado bacteriano foi transferida para microtubos devidamente identificados, que já continha 600µL de solução salina (0,9%). Em seguida, foi adicionado 20µL de ácido fórmico a 10% e a mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 10 segundos. Após,

realizou a adição de 20 $\mu$ L de acetonitrila (100%) à mistura e foi delicadamente homogeneizada por inversão e centrifugada (5.000 rpm/3 min). Na placa metálica contendo poços, foi pipetado uma alíquota de 1 $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra e 1 $\mu$ L da matriz polimérica composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Em seguida, mediante a secagem da mistura na placa foi colocado no aparelho para que o material fosse analisado no sistema MALDI-TOF - *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*. Cada amostra foi irradiada com um feixe de laser que a vaporiza havendo ionização das proteínas presentes, que foram aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente (Figura 2).

Figura 2. Representação da técnica de MALDI-TOF.



Fonte: Adaptado de: Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev, 2012. 36(2): p. 380-407.

Após a análise realizada pelo equipamento, a partir da obtenção de diferentes picos cujo conjunto é típico de cada espécie bacteriana, obteve um gráfico específico. Tendo um resultado interpretado com a base de dados computadorizada e o *score* da

identificação da amostra, definido como confiável a faixa de 2000-3000, sendo demonstrado no quadro 1.

Quadro 1. Classificação com base nos scores oriundos da técnica MALDI-TOFF.

Intervalo	Descrição	Símbolo
2.300 à 3.000	Alta probabilidade de identificação da espécie	(+++)
2.000 à 2.299	Identificação de gênero, provável identificação de espécie	(++)
1.700 à 1.999	Provável identificação de gênero	(+)
0.000 à 1.699	Sem identificação válida	(-)

Fonte: Adaptado de *Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results*.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À METICILINA E OUTROS ANTIBIÓTICOS

A fim de distinguir as amostras de *S. aureus* entre MSSA e MRSA foi realizado o teste de disco-difusão, determinando assim, a susceptibilidade à meticilina. Para isso, todas as amostras foram crescidas em ágar nutriente por 24h a 36°C, após o tempo de incubação, foi diluída uma alíquota de cada amostra em salina estéril a 0,85% em microtubos, até a obtenção de uma solução bacteriana, com turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland. Após, foram semeadas em ágar Müeller-Hinton (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) as amostras com auxílio de um swab estéril, a semeadura foi feita de forma convergente, ou seja, em 3 direções, para a obtenção de um crescimento confluyente.

Depois de 15 minutos, seguindo um mapa de inoculação (Figura 3), foram colocados os discos impregnados com antibióticos, sendo eles: Cefoxitina (30 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Sulfametoxazol-Trimetropim (25 µg), Teicoplanina (30 µg), Rifampicina (5 µg), Clindamicina (2 µg), Eritromicina (15 µg), Tetraciclina (30 µg) e Gentamicina (10 µg). Os antibióticos foram selecionados de acordo estudos disponíveis na literatura que indicaram os antibióticos mais prescritos para a população pediátrica, incluindo em casos de infecção de pele e tecidos moles (RESI

*et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2011; VAZ *et al.*, 2014). A teicoplanina, ciprofloxacina e a rifampicina, apesar de menos usadas no contexto da pediatria, foram adicionadas para avaliação da susceptibilidade das amostras a essas duas drogas.

A devida atenção foi tomada quanto a posição do disco de clindamicina (2 µg), que deve ser colocado a 20mm do disco de eritromicina (15 µg), margem a margem, com a finalidade verificar a indução de resistência a clindamicina por amostras resistentes a macrolídeos, designado como teste D. Os demais antibióticos foram colocados sob a placa respeitando um distanciamento de 15mm entre cada um disco. A leitura foi realizada após as 24h de incubação a 36°C, medindo o tamanho do halo e seguindo os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Comitê brasileiro (BrCAST) e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). A amostra *S. aureus* ATCC 25923 foi o controle sensível do teste, enquanto a amostra *S. aureus* ATCC 33591 foi o controle resistente.

Ressaltando, que todos os meios de culturas foram utilizados depois da autoclavação e todas as placas que o meio já tinha sido vertido, passaram pelo teste de esterilidade durante 24h na estufa a 36°C.

Figura 3. Disposição do Antibiograma para o Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA).



Fonte: Elaboração própria.

## 5.5 EXTRAÇÃO DO DNA POR *Chelex*-100 E PROTEINASE K

A extração de DNA das amostras foi realizada seguindo a metodologia proposta por Walsh, Metzger e Higuchi, 1991. Primeiramente, as amostras foram semeadas em ágar TSA (BD) e incubadas a 35 °C por 24 h. A solução de Chelex 5% (p/v) (Bio-Rad Laboratories Inc.; EUA) foi preparada utilizando água de injeção e foi armazenada em um tubo novo estéril, sendo utilizada durante o processo. Em seguida, 200 µL da solução de Chelex 5% e 2 µL de Proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen; Carlsbad, EUA) foram aliquotados em microtubos novos previamente identificados. Após a realização destas etapas, cerca de 3 a 5 colônias de cada amostra foram transferidas para os microtubos contendo a solução de Chelex e Proteinase K. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 56 °C por 1 h e, logo após, foram agitados por 10 s em vórtex. Dando continuidade, esses foram submetidos à fervura durante 10 min e novamente a etapa de agitação por 10 s foi realizada. Ao final, foi realizado o processo de centrifugação a 10000 xg por 3 min em microcentrífuga (Eppendorf; Hamburgo, Alemanha). O DNA presente no sobrenadante foi coletado e quantificado sendo utilizado um espectrofotômetro NanoVue Plus (Biochrom; Holliston, MA, EUA) e, posteriormente, foi armazenado a -20 °C.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DO SCC<sub>mec</sub> por PCR

A determinação do tipo de SCC<sub>mec</sub> foi realizada em todas as amostras identificadas como MRSA, segundo Milheiriço *et al* (2007). Esta reação consiste na amplificação de fragmentos de regiões específicas de cada tipo de SCC<sub>mec</sub>. Como controle interno da reação utilizamos o par de oligonucleotídeos MRS1 e MRS2, responsável pela amplificação do gene *mecA* (SANTOS *et al.*, 1999). Na tabela 1 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados, o tamanho dos amplicons e a especificidade para cada tipo de SCC<sub>mec</sub>.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha), utilizando-se um volume total de 50 µL, constituído por 3µL de DNA (cerca de 60ng), 5 µL de tampão 10x da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada deoxinucleotídeotri-fosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc.,

Gathersburg, MD, EUA), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 0,2 $\mu$ M dos oligonucleotídeos kdp F1, kdp R1, MRS1 e MRS2, 0,4 $\mu$ M dos oligonucleotídeos CIF2 F2, CIF2 R2, RIF5 R10, RIF5 R13, SCCmec V J1F, SCCmec V J1R, SCCmec III J1F, SCCmec III J1R e 0,8 $\mu$ M do oligonucleotídeo ccrC F2, ccrC R2, dcs F2, dcs R2, ccrB2 F2, ccrB2 R2, mecl P2 e mecl P3, completando-se com água para chegar ao volume final da reação.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do SCCmec.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Especificidade (tipo de SCCmec)	Concentração final na reação ( $\mu$ M)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I	0,4
KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	II	0,2
MECI P2 MECIP3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	II, III	0,8
CCR F2 CCR R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	V	0,8
SCCmec V J1 F SCCmec V J1 R	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	V	0,4
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCATCAATGC	414	III	0,4
dcs F2 dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I, II, IV, VI	0,8
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	311	II,IV	0,8
SCCmec IIIJIF SCCmec III JIR	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	III	0,4
MRS1 MRS2	TAGAAATGACTGAACGTCCG TTGCGATCAATGTTACCGTAG	154	Controle interno	1

A PCR consistiu em desnaturação inicial a 92°C por 4 a 28 min, seguida de 30 ciclos de 92°C por 30s, 53°C por 30 seg e 72°C por 1 min, finalizada com um período de extensão final a 72°C por 4 min. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, em TBE (0,89M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH

8,2) 1X. Após a corrida a 90V, o gel foi submerso em solução com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 40 min e a imagem capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Marnela-Valleé, França). Como padrão de tamanho de DNA, utilizamos um marcador de 100 pb (Biotools).

## 5.7 COLETA DE DADOS ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO

Informações sobre potenciais fatores de risco associados à colonização por *S. aureus*, foram obtidas por meio de entrevistas realizadas por questionário aos pais ou responsáveis pela criança. Foram obtidas informações sobre aspectos relacionados à saúde, como: internações e motivos da internação, uso de antibiótico entre o período de 2018/2019, acompanhamento de doenças crônicas e infecção de pele. As entrevistas foram realizadas pela aplicação de 5 perguntas feitas através de ligação (anexo 2).

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste Exato de Fisher, por meio do software GraphPad Prism, v. 4. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado indicativo de significância.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

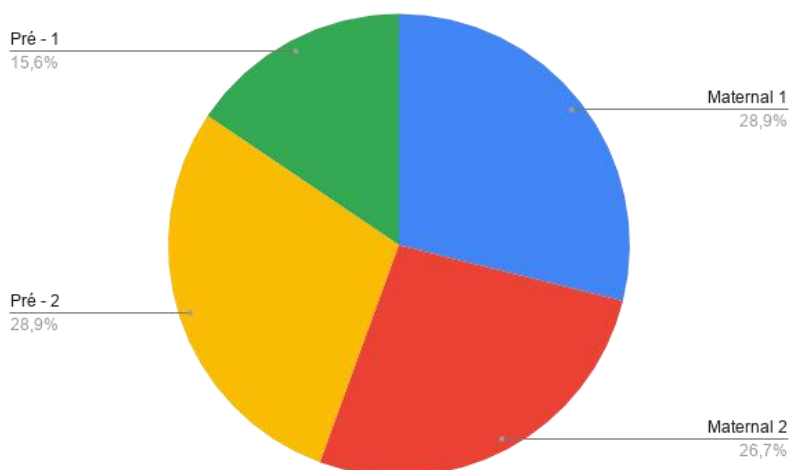
### 6.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Ao decorrer do estudo, 45 crianças foram analisadas seguindo os critérios de inclusão. A população foi dividida em 20 (44,4%) meninos e 25 (55,6%) meninas. Dessas crianças, 20 (44,4 %) eram do pré-I / pré-II e 25 (55,6 %) eram do maternal I e II. Somente três (6,66%) crianças tinham grau de parentesco entre si e essas eram de diferentes classes escolares. Das 45 crianças avaliadas, três (6,7%) não apresentaram nenhum tipo de crescimento bacteriano após o cultivo do swab e 13 (28,9%) crianças apresentavam mais de uma espécie bacteriana colonizando suas narinas, totalizando 56 amostras isoladas.

Gráfico 1. Distribuição das crianças analisadas por sexo.



Gráfico 2. Percentual de crianças em classes escolares da Escola André Vinícius de Souza Gonçalves.



De acordo com gráfico 2, foi possível observar que das 45 crianças analisadas, 13 (28,9%) eram do maternal I, 12 (26,7%) do maternal II, 7 (15,6%) do Pré-I e 13 (28,9%) do Pré-II.

## 6.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

As amostras bacterianas semeadas em ágar Manitol Salgado que apresentaram qualquer tipo de crescimento foram consideradas sugestivas de *Staphylococcus*. Aquelas que levaram a uma mudança de coloração no meio, com formação de colônias amareladas, foram indicativas para *S. aureus*. Isso ocorre devido à concentração mais elevada de NaCl, que favorece o crescimento de espécies de *Staphylococcus* e à presença da substância chamada vermelho de fenol (indicador de pH), que altera a cor do meio caso ocorra a fermentação do carboidrato manitol (figura 5). Essa mudança na coloração é característica de *Staphylococcus aureus*, mas pode ocorrer em raras situações com algumas outras espécies deste gênero, como *S. haemolyticus* (KONEMAN, 2008).

Figura 4. Amostras semeadas em ágar Manitol Salgado com crescimento bacteriano e presença de fermentação.

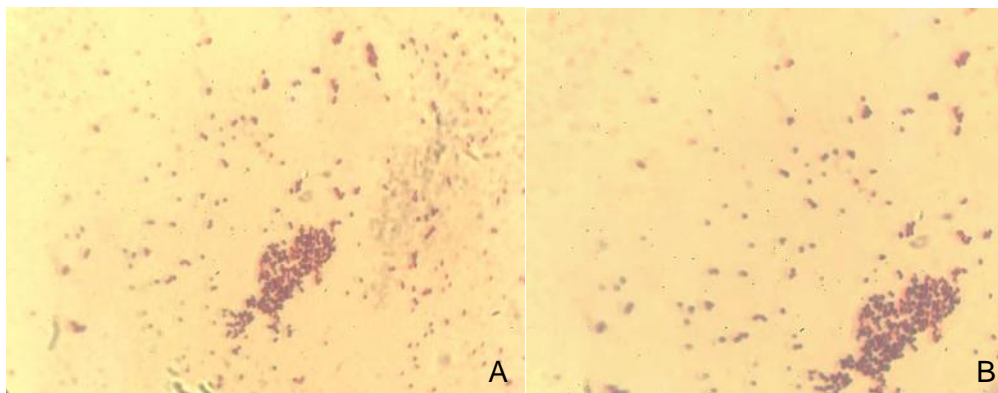


Fonte: Acervo pessoal

De acordo com a identificação das amostras positivas para o crescimento bacteriano em ágar manitol salgado, foi realizada a análise do aspecto morfotintorial através da coloração de Gram. Foi possível observar que todas as amostras

apresentavam coloração arroxeada característico de bactérias Gram positivas (Figura 5).

Figura 5. Imagem A e B - amostras sugestivas de *Staphylococcus* através da coloração de Gram.

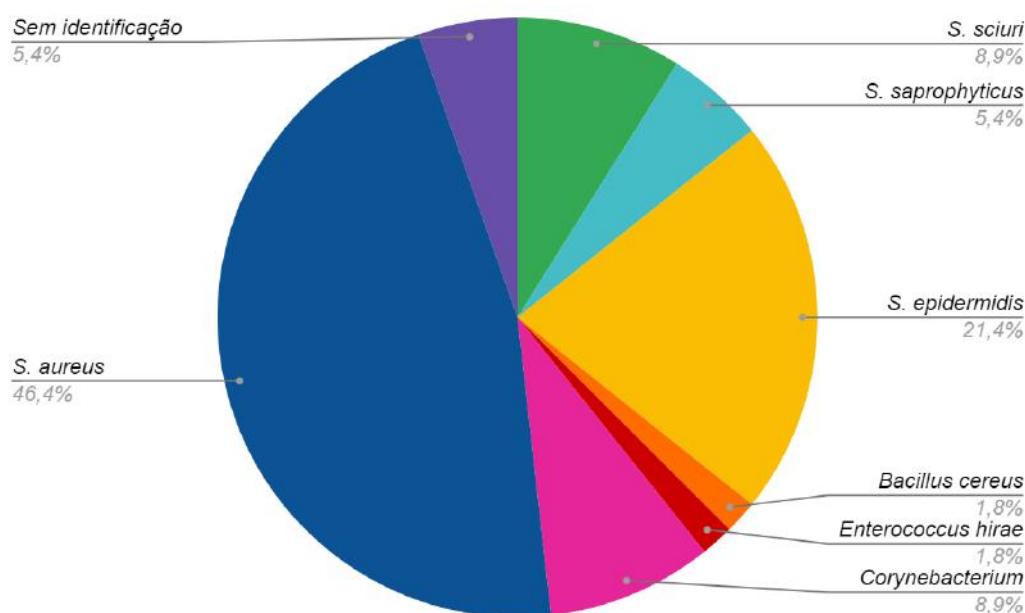


Fonte: Acervo Pessoal.

Todas as amostras que apresentaram crescimento sugestivo de *Staphylococcus* no ágar manitol salgado e tiveram aspecto característico de cocos Gram positivos na coloração de Gram foram encaminhadas para identificação de espécies via espectrometria de massas. A análise por MALDI-TOF, verificou, que das 56 amostras isoladas, 26 (46,4%) foram positivas para *S. aureus* e 20 (35,7%) amostras foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Um total de três (5,4%) amostras não foram passíveis de identificação pelo MALDI-TOF. Curiosamente, a análise por espectrometria de massas também permitiu identificar duas amostras que foram identificadas, respectivamente, como *Bacillus cereus* e *Enterococcus hirae* (1,8% cada) e cinco (8,9%) que foram pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. Uma vez que já é bem estabelecido que o ágar manitol salgado com incubação em aerobiose, a 37°C, consegue inibir a grande maioria dos microrganismos presentes na microbiota, com exceção de espécies dos gêneros *Bacillus* e *Micrococcus*. Bactérias Gram Negativas são inibidas em sua totalidade (WHITE *et al.*, 1988). Também, embora *Corynebacterium* e *Bacillus cereus* possam crescer neste meio, a morfologia observada na coloração de Gram poderiam auxiliar a desconsiderar tais microrganismos como *Staphylococcus*. No entanto, a

microscopia demonstrou bactérias com aspecto de bastonetes muito curtos, confundíveis com cocos. Assim, foram submetidos também à espectrometria de massas.

Gráfico 3. Distribuição das espécies bacterianas identificadas e confirmadas pela técnica de MALDI-TOF.



Dentre as 20 amostras de SCN, a maior parte (12/56; 21,4%) foram da espécie *Staphylococcus epidermidis*, seguido de *S. sciuri* (5/56; 8,9%) e *S. saprophyticus* (3/56; 5,4%). O gráfico 3 ilustrado abaixo demonstra a distribuição das espécies bacterianas identificadas. Levando em conta um total de 46 amostras de *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* correspondeu a 56,5% do total e *S. epidermidis* a 26%. Estas taxas foram semelhantes ao reportado recentemente por outros autores em diferentes países. Hirose e colaboradores (2019) na cidade de Hokkaido, no Japão, avaliaram 526 crianças saudáveis quanto à colonização por *Staphylococcus*, a partir da análise de saliva. Dentre 248 amostras de *Staphylococcus* isoladas, 57% (143) foram *S. aureus* e 33% (84) *S. epidermidis*. Em Uganda, na África, Kateete e colaboradores (2020) identificaram 513 amostras de *Staphylococcus* de 485 crianças

e verificaram que *S. aureus* foi a espécie dominante (37,6%) seguido de *S. epidermidis* (25,5%, 131/513). Esses dados somados ao encontrados por nosso estudo podem indicar que crianças podem ser mais colonizadas por *S. aureus* do que por espécies coagulase negativas. Além disso, entre os SCN, os *S. epidermidis* parece ser prevalente entre crianças saudáveis.

Por outro lado, quando avaliamos a ocorrência de *S. aureus* nas 45 crianças avaliadas, a prevalência desta espécie foi de 57,8%, o que é bem superior ao encontrado por Hirose et al. (2019), que foi de 27% (143 crianças colonizadas em um total de 526). As taxas inferiores ao encontrado por nosso estudo pode estar relacionado ao fato de os autores terem avaliado a saliva das crianças envolvidas no estudo. Na Itália, Esposito e colaboradores analisaram amostras de orofaringe e de swab nasal de crianças saudáveis com menos de 10 anos de idade. A taxa de *S. aureus* foi de 30,4% nas amostras de orofaringe, resultados próximos ao verificado por Hirose et al. (2019). Tais dados reforçam a hipótese de que existe uma elevada frequência de *S. aureus* em crianças saudáveis e confirmam que a amostra de swab das narinas é a forma mais sensível de detectar a presença de *S. aureus*, especialmente em crianças.

Das 45 crianças incluídas no estudo, 29 (64,4%) apresentavam apenas uma espécie bacteriana nas narinas, enquanto 13 (28,9%) apresentaram colonização por mais de uma espécie. Dentre os 29 casos de crianças colonizadas por uma única espécie, verificou-se uma maior frequência da espécie *S. aureus* (19/29; 65,6%) ocorrendo isoladamente. A espécie *S. epidermidis* foi encontrada isoladamente em quatro crianças, e a espécie *S. sciuri* foi encontrada em três alunos avaliados.

Por outro lado, uma associação das espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* foi verificada em três (6,67%) crianças. A Tabela 2 descreve os tipos de co-colonização encontrados entre as crianças do presente estudo.

Tabela 2. Avaliação da co-colonização nas crianças que apresentavam mais de uma espécie bacteriana.

Relação entre Espécies	n de crianças	% de crianças
<i>S. aureus</i> / <i>S. epidermidis</i>	3	6,67
<i>S. aureus</i> / <i>S. sciuri</i>	1	2,22
<i>S. saprohyticus</i> / <i>Corynebacterium</i>	1	2,22
<i>S. epidermidis</i> / <i>Bacillus cereus</i>	1	2,22
<i>S. aureus</i> / <i>Corynebacterium</i>	1	2,22
<i>S. epidermidis</i> / <i>Corynebacterium</i> / <i>S. epidermidis</i>	1	2,22
<i>S. aureus</i> / <i>S. saprohyticus</i>	1	2,22
<i>S. epidermidis</i> / <i>S. sciuri</i>	1	2,22
<i>S. aureus</i> / NI	2	4,44
<i>S. epidermidis</i> / NI	1	2,22

Legenda: NI - espécie não identificada por MALDI-TOF

O fato de que a maioria das crianças apresentou apenas *S. aureus* ou *S. epidermidis* nas narinas não foi surpreendente, pois estudos prévios demonstram que *S. epidermidis* tem um efeito inibidor sobre *S. aureus*, atuando especificamente na produção de pequenas moléculas que atuam na regulação negativa de genes envolvidos na formação do biofilme de *S. aureus*, o que dificulta que ambas as espécies sejam detectadas simultaneamente em um mesmo indivíduo (FREDHEIM *et al.*, 2014; GLATTHARDTI *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2011). Ainda assim, em nosso estudo, detectamos três crianças que apresentavam colonização tanto por *S. aureus* quanto por *S. epidermidis*. Estudos mais aprofundados devem ser realizados posteriormente nessas amostras, a fim de compreender por que, nesses raros casos, *S. aureus* e *S. epidermidis* co-existem na mucosa dessas crianças.

### 6.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus*

As 46 amostras confirmadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antibióticos através do teste de difusão

a partir do disco, de acordo com o exemplificado na Figura 6. Destas amostras, 30 (53,57%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico.

Figura 6. Amostra bacteriana submetida ao teste de susceptibilidade aos antibióticos.



Fonte: Acervo pessoal. Imagem adaptada via aplicativo Canva.

A análise da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada através da leitura dos halos de inibição produzidos por cada disco de antibiótico após o tempo de incubação, seguindo os pontos de corte do CLSI e BrCAST. Segundo o BrCAST, dentre as 26 amostras de *S. aureus*, sete (26,9%) foram resistentes à cefoxitina, sendo classificadas como MRSA. Mais uma vez os resultados foram similares ao relatado na literatura. Kateete e colaboradores (2020) relataram 28,5% de resistência entre amostras de *S. aureus* isoladas de crianças em Uganda. Em Seul, Coreia do Sul, Lee e colaboradores (2011) identificaram através da triagem nasal 164 (38,3%) amostras de *S. aureus*, sendo 40 (24,4%) resistente à meticilina. No Brasil, Braga *et al.* (2014) relataram que, de 500 crianças que frequentavam creches da cidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro, 240 eram colonizadas por *S. aureus* e 31 dessas amostras (12,9%) eram MRSA. Essa taxa foi realmente inferior ao encontrado em nosso estudo, que também foi conduzido em uma cidade do estado do Rio de Janeiro. Porém, ao analisar o estudo de Braga e colaboradores (2014), é possível avaliar que

a taxa de resistência a meticilina em *S. aureus* foi de 20,7% entre amostras coletadas de crianças oriundas de creches localizadas em aglomerados subnormais (“favelas”), enquanto entre crianças de creches fora destes locais, a taxa de resistência em *S. aureus* foi de apenas 10,4%. Os autores propõem que viver em favelas seja um fator de risco importante para a colonização por MRSA. Em nosso estudo, a escola avaliada não se localizava em uma favela. No entanto, por ser uma instituição pública, atende crianças de famílias com menor poder aquisitivo, o que pode, em parte, justificar as taxas mais elevadas de resistência.

Dentre as 26 amostras de *S. aureus*, foram encontradas 14 (53,8%) amostras resistentes à eritromicina, três (11,54%) resistentes à gentamicina, seis (23,1%) à clindamicina e duas (7,7%) amostras resistentes à tetraciclina, ciprofloxacino e sulfametoxazol/trimetropim, cada um. Para os antibióticos rifampicina e teicoplanina, foi detectada uma (3,8%) amostra resistente a cada uma dessas drogas. Entretanto, quando interpretamos os halos de inibição através do BrCAST, foi possível verificar uma resistência intermediária (halos >22mm e <50mm) em todas as amostras testadas para ciprofloxacino (BrCAST, 2021). Discrepâncias também foram detectadas para clindamicina, rifampicina, tetraciclina e gentamicina.

Observando o perfil de resistência das amostras de acordo com as análises do CLSI e BrCAST, foi possível notar algumas diferenças nos resultados para alguns antibióticos. Um fato importante, pois interfere no resultado.



Gráfico 4. Perfil de resistência plena das 26 amostras de *S. aureus* frente aos antibióticos testados, segundo os critérios do BrCAST e CLSI.

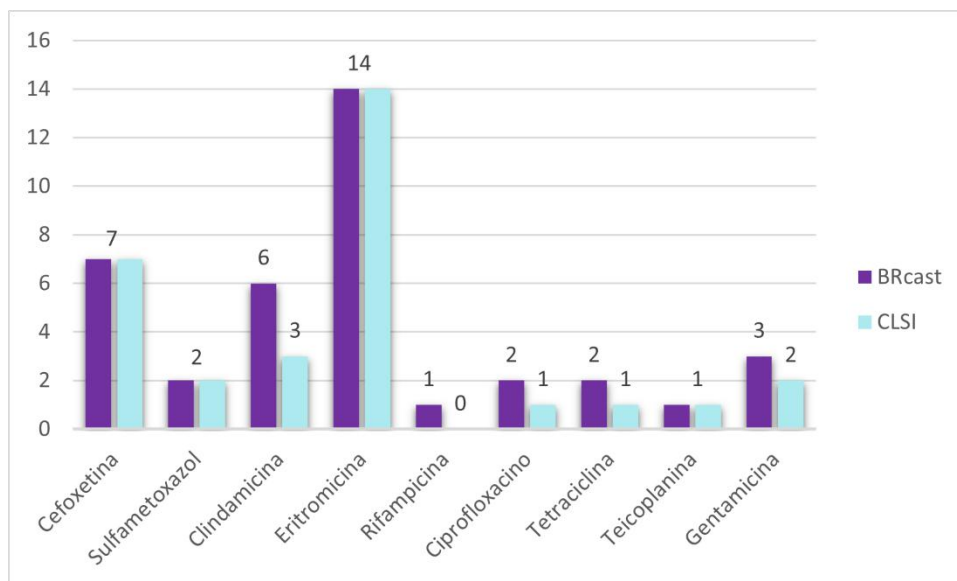
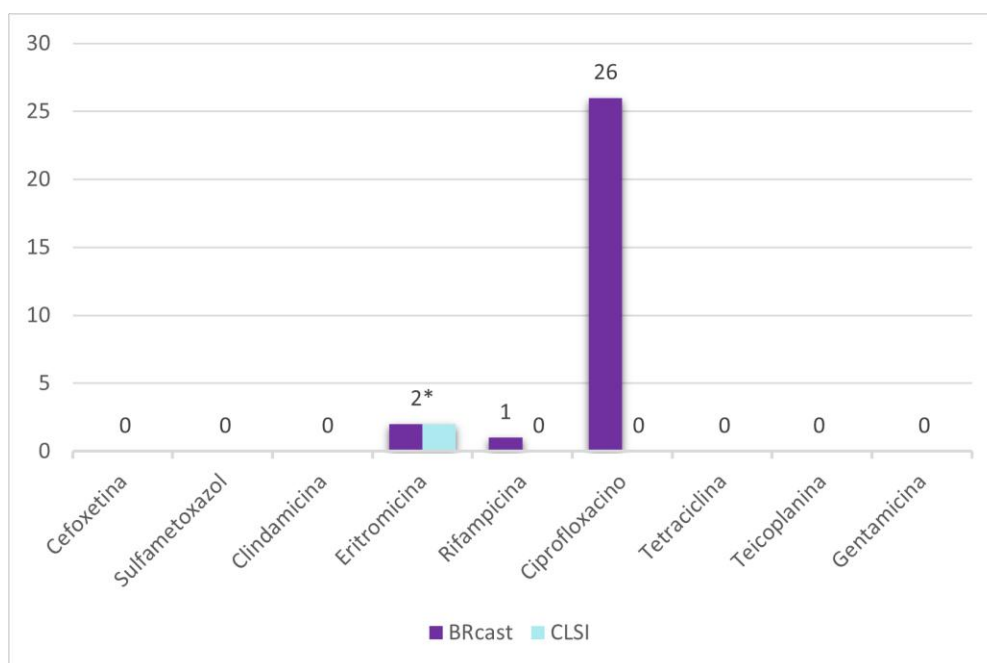


Gráfico 5. Perfil de resistência intermediária das 26 amostras de *S. aureus* frente aos antibióticos testados do BrCAST e CLSI.



\* As mesmas amostras demonstraram resistência intermediária para ambos os parâmetros.

Apesar da literatura científica em sua maioria utilizar os critérios do CLSI para interpretação de testes de susceptibilidade, no Brasil, em 2018, o Ministério da Saúde tornou compulsório que os laboratórios clínicos sigam os critérios do BrCAST. Em nosso estudo, os critérios do CLSI classificaram a maioria das amostras como sensíveis a todos os antibióticos, enquanto o BrCAST foi capaz de detectar um percentual maior de resistência intermediária. E, segundo o próprio BrCAST:

*Um microrganismo é definido como intermediário a determinado antimicrobiano quando existe um certo grau de incerteza na sua eficácia terapêutica. Implica que a infecção causada por este isolado pode ser tratada se ocorrer em locais onde o fármaco esteja fisicamente concentrado ou quando altas doses do fármaco possam ser usadas. (BrCAST, 2019)*

ainda, de acordo com a ANVISA:

*A resistência intermediária a um antimicrobiano inclui cepas cujas concentrações mínimas inibitórias (CMIs) do antimicrobiano se aproximam das concentrações que a droga atinge no sangue e nos tecidos, e cuja taxa de resposta pode ser menor do que aquela encontrada para cepas sensíveis. RI implica em eficácia clínica em sítios corpóreos onde o antimicrobiano é fisiologicamente concentrado ou quando uma dose maior do antimicrobiano que a dose usualmente recomendada pode ser utilizada (exemplo: altas doses de penicilina são efetivas no tratamento de pneumonia pneumocócica por uma cepa com RI). - (II SEMINÁRIO NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES EM SERVIÇO DE SAÚDE, 2008)*

No presente estudo, segundo o CLSI, todas as amostras isoladas seriam resistentes, de forma intermediária, ao ciprofloxacino. De fato, o ciprofloxacino não é normalmente recomendado para uso em crianças, exceto em casos de infecções

graves como febre tifóide, disenteria por *Shigella* ou meningite causada por enterobactérias. No entanto, pode ser administrada em casos de infecção pneumocócica recorrente, incluindo otite (GENDREL *et al.*, 2003). Porém, nosso estudo ilustra a disparidade na que ocorre entre o CLSI e o BrCAST, especialmente no que se refere às fluoroquinolonas. Caso essas amostras sejam transmitidas a adultos, o tratamento pode ser comprometido, devido a diferenças na interpretação dos resultados.

Independente do critério utilizado, foi verificada uma elevada taxa de resistência plena para a eritromicina entre as amostras de *S. aureus* avaliadas (53%). Além disso, entre as sete amostras MRSA, seis foram plenamente resistentes ao macrolídeo e uma apresentou resistência intermediária, de forma que 100% das amostras MRSA isoladas nesse estudo apresentaram algum tipo de resistência à eritromicina. Isto é particularmente preocupante pois a eritromicina é um antibiótico bastante prescrito na rotina pediátrica. A eritromicina oral tem baixo custo e é bem tolerada por pacientes menores de 12 anos. É recomendada, juntamente com beta-lactâmicos, para o tratamento de impetigos e outras dermatoses, sendo inclusive uma alternativa em casos de infecções por amostras MRSA (LADHANI & GARBASHI, 2012). No entanto, estudos no Brasil já apontam uma elevada taxa de resistência a esse antibiótico. Sabe-se que, entre amostras MRSA de origem comunitária isoladas de crianças, 78% são resistentes à eritromicina (PATERNINA-DE LA OSSA *et al.*, 2018), o que foi superior, porém compatível com as elevadas taxas identificadas no nosso estudo. Fora do Brasil, no entanto, as taxas de resistência à eritromicina em *S. aureus* isolados da população pediátrica são bastante variados, oscilando entre 3% e 50% (HIROSE *et al.*, 2019; KATEETE *et al.*, 2020). Uma hipótese é que a resistência à eritromicina, que é codificada pelos genes *erm*, normalmente carregado em transpósons e plasmídios (NICOLA *et al.*, 1998), possa estar relacionado a determinados clones, mais ou menos prevalentes dependendo do país.

Tabela 3. Avaliação do perfil de susceptibilidade e multirresistência das amostras *S. aureus*.

Perfil de Susceptibilidade	n de amostras	% de amostras
Sensível a todos antibióticos	9	34,6%
Resistente somente à 1 antibiótico	5	19,23%
Resistente à 2 antibióticos	7	26,9%
Resistente à 3 antibióticos	1	3,8%
Resistente à 4 antibióticos	3	11,53%
Resistente à 6 antibióticos	1	3,8%

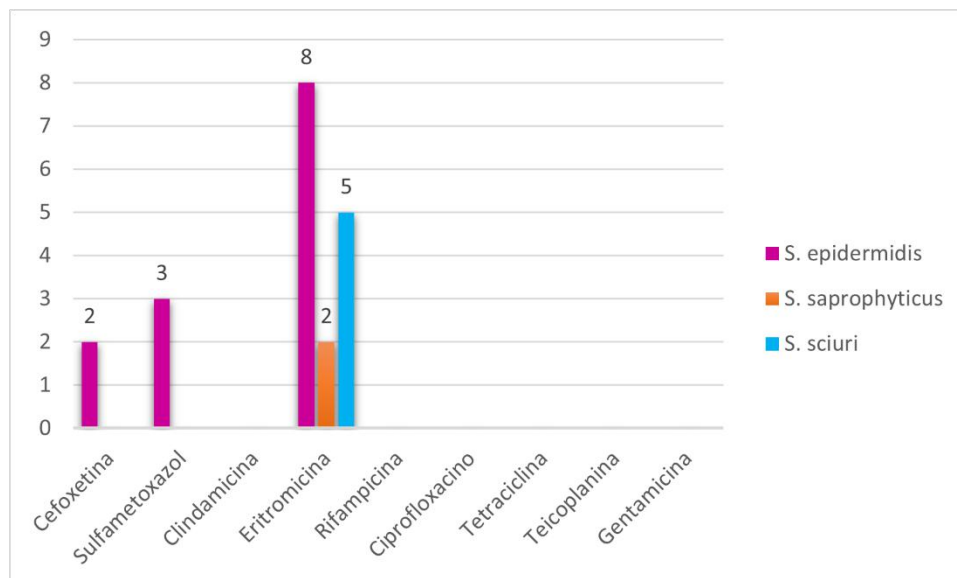
Das 20 amostras coagulases negativas, 16 apresentaram resistência a algum dos antibióticos testados, de acordo com a BrCAST e CLSI, sendo nove de *S. epidermidis*, duas de *S. saprophyticus* e cinco amostras de *S. sciuri*. Vale ressaltar que considerando as amostras de *S. sciuri* analisadas pelos valores do CLSI, nenhuma amostra demonstrava resistência.

A resistência à cefoxitina foi verificada em 2 (16,6%) amostras *S. epidermidis* e em nenhuma amostra de *S. saprophyticus* e de *S. sciuri*. De fato, Jamaludin e colaboradores (2008) já haviam estabelecido em uma revisão de literatura sobre resistência à meticilina em SCN no Japão, que *S. epidermidis* é a espécie coagulase negativa onde a resistência à meticilina é mais prevalente.

Entre as amostras de SCN o maior percentual de resistência foi para eritromicina (15 amostras com resistência plena, 75%), seguido de sulfametoxazol/trimetoprim (3 amostras, 15%). Todas as amostras SCN demonstraram sensibilidade à gentamicina, tetraciclina, rifampicina e teicoplanina e todas tiveram resistência intermediária a ciprofloxacino, de acordo com BrCAST e CLSI. Com relação às amostras de *S. epidermidis*, quatro apresentaram resistência somente a eritromicina, três amostras demonstraram, ao mesmo tempo, resistência tanto a sulfametoxazol/trimetoprima e eritromicina, uma amostra foi resistente a cefoxitina e a eritromicina, e uma outra amostra foi resistente somente a cefoxitina. Em *S. sciuri*, todas as 5 amostras apresentaram resistência a eritromicina e dentre essas amostras, dentre elas as amostras apresentaram resistência intermediária, sendo respectivamente, quatro amostras a sulfametoxazol/trimetoprim e duas a clindamicina. Dentre as amostras de *S. saprophyticus*, também foi detectada

resistência a eritromicina em duas amostras, sendo que uma delas também apresentou resistência à sulfametoxazol/trimetoprim (Gráfico 6).

Gráfico 6. Perfil de resistência das amostras SCN.

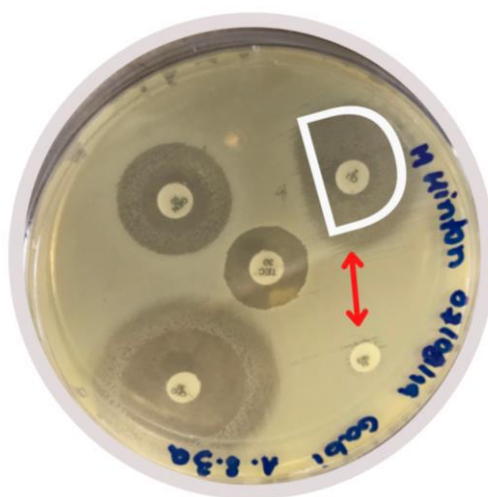


Em um estudo com amostras de *S. epidermidis* resistentes à meticilina isoladas de crianças no Irã, foram também encontradas elevadas taxas de resistência à eritromicina e sulfametoxazol/trimetoprim (85% e 91,2%, respectivamente). O elevado percentual de resistência à eritromicina detectado entre amostras de SCN, também verificado entre os *S. aureus* isolados no estudo, chama atenção para a disseminação da resistência a este antibiótico, o que, como já mencionado anteriormente, pode comprometer sua utilização, que é amplamente utilizado entre pacientes pediátricos (LADHANI & GARBASH, 2012). Além disso, SCN podem ser vetores de transmissão de resistência à macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas para *S. aureus* (JUDA *et al.*, 2016)

Apesar do baixo índice de resistência aos demais antibióticos, é importante ressaltar a que presença, ainda que em baixas taxas, de resistência nessas espécies coagulase negativas, pode ser um indicativo de resistência cruzada, o que pode levar à disseminação de marcadores de resistência (NASCIMENTO *et al.*, 2009; CLSI, 2007).

De forma concomitante ao teste de suscetibilidade foi possível observar o fenômeno D por meio da utilização dos antibióticos eritromicina e clindamicina. Sendo feita assim, a detecção de resistência indutível à clindamicina em amostras estafilocócicas, detectada pelo antagonismo da atividade da clindamicina e a ao fenótipo MLSB (Macrolídeos, Lincosaminas e Estreptograminas B). Foram identificadas 1 (1,78 %) amostras com o fenômeno D (Figura 7).

Figura 7. Teste D positivo com achatamento do halo entre eritromicina e clindamicina.



Fonte: Acervo Pessoal.

#### 6.4 PREVALÊNCIA DE MRSA EM CRIANÇAS

Entre as 56 amostras das crianças que frequentam creches no município de Macaé, foi obtida uma prevalência de 26 (46,4%) amostras que foram positivas para *S. aureus*. Outros estudos um pouco mais antigos, como Lamaro-Cardoso et al. (2009) em Goiânia, Goiás, encontrou de 1.192 amostras de crianças de 2 a 5 anos idade uma prevalência de 371 (31,1%) para *S. aureus*; Sedighi et al. (2011) no Irã, observou que 148 (29,6%) em crianças de 1 a 6 anos de idade em creches estavam colonizadas por *S. aureus*. Os estudos citados apresentavam um número de amostras (n) superior ao do presente estudo, o que pode limitar os dados obtidos em nossos estudos como altas taxas da prevalência de colonização. No entanto, a prevalência

encontrada foi semelhante ao estudo de Braga et al. (2014), conduzido também no Rio de Janeiro, que observou 240 crianças que frequentavam creches em Niterói, Brasil e identificou 48% de prevalência. Tais dados podem indicar a elevada ocorrência de colonização por *S. aureus* em crianças fluminenses.

Foram identificadas sete amostras que foram resistentes à cefoxitina, sendo consideradas MRSA, entre todas as crianças avaliadas, do maternal e pré 1/2 (2 e 5 amostras, respectivamente) através da susceptibilidade antimicrobiana, o que consistiu em 15,5% de amostras MRSA. Em comparativo com outros estudos como Lee et al. (2011), na Coreia do Sul, foi observado que 9,3% das crianças estavam colonizadas por MRSA. Porém, no Brasil, a prevalência observada parece ser muito próxima ao encontrado em nosso estudo. Em Vitória da Conquista, Brasil, De Carvalho et al. (2017) obtiveram 15,7% de crianças MRSA positivas. Em Niterói, Braga e colaboradores (2014) detectaram 6,2% de crianças matriculadas em creches da cidade carregando o patógeno. Dessa forma, nossos resultados indicam uma taxa de MRSA compatível com a literatura. No entanto, uma das limitações do nosso estudo foi o número pequeno de crianças envolvidas, o que impede uma análise estatística mais aprofundada. Além disso, devido à pandemia e a problemas de ordem técnica e logística, não foi possível uma análise molecular mais aprofundada. Assim, uma hipótese a ser confirmada posteriormente, é que tenha ocorrido um pequeno surto de algum clone específico entre crianças desta creche. Essa hipótese pode ser testada através da análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico seguido de eletroforese em campo pulsado. Tal técnica já foi iniciada (anexo 3) e será concluída para a publicação dos resultados deste estudo em revistas científicas. Os resultados obtidos por esta técnica permitirão afirmar se as amostras MRSA identificadas pertencem a um mesmo clone (e, portanto, trata-se de um surto) ou se tem características genéticas distintas, indicando que cada criança adquiriu a cepa em momentos diferentes, o que sugere que a taxa de MRSA é realmente alta e não há transmissão entre os alunos.

No estudo vai de encontro ao proposto na literatura, de que o maior tempo que as crianças frequentam as creches correlaciona em uma elevada propensão da colonização de microorganismos patogênicos em crianças e desenvolvimento de infecções, evidenciando as creches como locais de disseminação da bactéria, ou

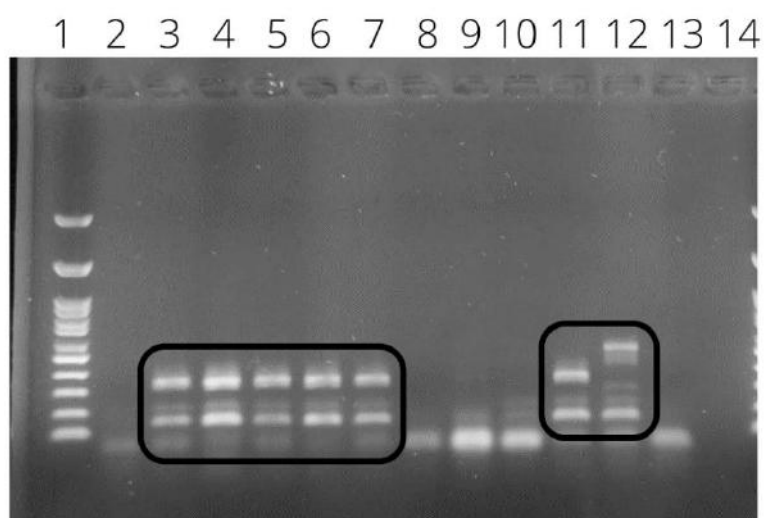
seja, é de extrema importância epidemiológica (PEDRAZA D F *et al.*, 2012; NESTI & GOLDBAUM, 2007). Isto porque ao avaliarmos a distribuição de MRSA pelas turmas, podemos observar uma (2,22%) do maternal I, duas (4,44%) do maternal II, quatro (8,9%) do Pré II, indicando um aumento da frequência de MRSA diretamente proporcional a idade.

De acordo com Esposito e colaboradores (2014), as taxas de colonização são maiores entre as crianças mais velhas, sugerindo que a idade pode gerar uma maior taxa de colonização. Também, Braga e colaboradores (2014) sugeriram que crianças maiores de 36 meses tinham maior probabilidade de colonização, assim como aquelas que estavam há mais tempo frequentando a creche.

### 6.5 AVALIAÇÃO DO SCC*mec* ATRAVÉS DE PCR

A caracterização do SCC*mec* nas sete amostras identificadas como MRSA revelou que cinco (71,43%) delas apresentaram o SCC*mec* IV. Duas amostras não apresentaram nenhum tipo de SCC*mec*.

Figura 8 - Eletroforese em gel para detecção do SCC*mec* após PCR.



Legenda: 1 - Padrão de peso molecular 100pb; 2 a 8 - Amostras identificadas como MRSA no presente estudo; 9 - Amostra controle SCC*mec* II; 10 - Amostra



controle SCCmec III; 11 - Amostra controle SCCmec IV; 12 - Amostra controle SCCmec V; 13 - Controle negativo (branco); 14 – sem amostra. Fonte: Elaboração Própria.

O fato da maioria das amostras carrear o SCCmec IV indica a origem comunitária da maioria dessas amostras. No estudo de Ho *et al.* (2012), as crianças apresentaram como perfil predominante o SCCmec IV e V. De Carvalho e colaboradores em (2017), obteve que (8/11 amostras; 72,7%) foram do tipo SCCmec IV e três (27,2%) eram do tipo SCCmec V. E Lee *et al.* (2011), observou que as crianças colonizadas com MRSA possuíam o SCCmec tipo IV predominante. Assim, é sugestivo que, de fato, a resistência aos antibióticos está circulando na comunidade e sendo carregado por amostras encontradas em crianças saudáveis.

O consumo por parte dos antibióticos possui influência direta na falta de controle dos prescritores; o uso incorreto das dosagens por erros de prescrição, período a ser utilizado, pela comercialização de antibióticos sem prescrição médica, a falta do diagnóstico prévio e pela automedicação (ALVAREZ, Carlos; LABARCA, Jaime; SALLES, Mauro, 2010; FRANCO, J. M. P. L. *et al.*, 2015). E assim, a utilização inadequada destes medicamentos pode acarretar um crescimento excessivo e descontrolado de resistência aos antibióticos (FRANCO, J. M. P. L. *et al.*, 2015), o que pode justificar a elevada frequência de amostras MRSA de origem comunitária encontrada em nosso estudo e em estudos prévios. Assim, há a necessidade da inserção de novos fármacos para tratamento, pois foi possível notar que as taxas de resistências poderiam estar diretamente associadas ao uso dos antibióticos. Neste contexto, vale ressaltar a importância do profissional farmacêutico atuando junto aos outros profissionais de saúde, com a finalidade de auxiliar na propagação de patógenos no ambiente hospitalar e comunitário, além de poder evitar o uso inadequado dos antibióticos, e conseqüentemente possibilitar menores taxas de infecções, de mortalidades e diminuir o tempo de internação (FRANCO, J. M. P. L. *et al.*, 2015).

Duas amostras apresentaram resultado negativo após a PCR, apesar de apresentarem resistência à cefoxitina no teste de disco difusão. Uma possibilidade é

que essas amostras sejam carreadoras do *mecC*, um gene homólogo ao *mecA*, que vem sendo identificado no Brasil e no mundo (García-Garrote et al., 2014; Alves et al., 2020). No entanto, mais estudos moleculares são necessários para confirmar esta hipótese.

## 6.6 DADOS DAS CRIANÇAS PRESENTE NOS ESTUDOS

De acordo com o estudo, 45 crianças foram analisadas seguindo os critérios de inclusão e destas, 21 crianças participaram da coleta de dados através dos seus pais e responsáveis. Na Tabela 4, foi possível traçar o perfil de dados das crianças que participaram do estudo. As variáveis escolhidas foram baseadas em diversos estudos, sendo escolhidas poucas perguntas, para não prejudicar a entrevista, que foi realizada por telefone.

Devido ao momento de pandemia não foi possível realizar o questionário com todos os pais. Além disso, outro fator limitante foram as crianças que eram do pré-2 no ano de 2019 e, no ano de 2020, não estavam mais a estudar naquela escola.

Tabela 4. Perfil de dados sobre as crianças avaliadas

Variáveis	<i>S. aureus</i>		Não <i>S. aureus</i>		P
	n	%	n	%	
<b>Histórico de Internação</b>					
Sim	10	22,2	3	6,7	0,1637
Não	3	6,7	5	11,1	
<b>Uso de Antibiótico entre 2018/2019</b>					
Sim	10	22,2	6	13,3	1,0000
Não	3	6,7	2	4,4	
<b>Qual antibiótico?</b>					
Amoxicilina + clavulanato	7	15,5	4	8,9	1,0000
Diversos	3	6,7	2	4,4	
<b>Presença de alguma infecção de pele</b>					
Sim	4	8,9	1	2,22	0,6065
Não	9	20,0	7	15,5	
<b>Possui familiares com infecção de pele</b>					
Sim	1	2,2	1	2,22	1,0000
Não	12	26,7	7	15,5	
<b>Possui alguma doença crônica</b>					
Sim	5	2,2	0	-	0,1107
Não	8	17,8	8	17,8	

Legenda: Não aureus - amostras SCN, sem crescimento bacteriano; n - número de amostras;  
P - valor P.

De acordo com o valor P calculado pelo teste Fisher, não é possível afirmar a associação entre as variáveis, não permitindo assim dizer de fato que os parâmetros pesquisados tenham alguma associação ou sejam significativamente mais comuns em crianças com colonização por *Staphylococcus aureus*. É importante ressaltar que nem todas as crianças participaram dessa parte do estudo, o que possivelmente influenciou no resultado calculado. Porém, estudos prévios avaliando crianças que frequentam creches e escolas tem encontrado como fatores de risco variáveis que não puderam ser adequadamente avaliadas em nosso espaço amostral. Por exemplo, Braga e colaboradores (2014) demonstraram que os fatores de risco associados ao carreamento de *S. aureus* são: idade maior a três anos, permanência na creche por mais de um ano e uso de antibióticos dos últimos 30 dias. Em nosso estudo, a grande parte das crianças tinha mais de 3 anos. Além disso, nosso questionário foi aplicado alguns meses após a coleta das amostras, de forma que não poderíamos averiguar adequadamente se houve uso de antibióticos nos 30 dias anteriores à coleta.

Nosso estudo vai de encontro ao que vem sendo reportado na literatura, que indicam a espécie *S. aureus* como principal patógeno colonizador entre crianças que frequentam creches. Ainda assim, são necessários estudos contínuos, pois a idade pré-escolar e a presença cada vez mais constante das crianças em creches, favorecem a colonização por espécies de *Staphylococcus*, que podem ser causas de infecções importantes. A elevada prevalência de cepas *S. aureus* resistentes em crianças saudáveis torna necessário o interesse da sociedade científica no investimento desses estudos.

## 7. CONCLUSÕES

- Foram detectadas 56 amostras entre 45 crianças avaliadas. A maior parte das crianças estava colonizada por *S. aureus*, mas também foram detectadas amostras de *S. epidermidis* (21,4%), *S. saprophyticus* (5,4%) e *S. sciuri* (8,9%).
- No presente estudo, 46,4% das crianças estavam colonizadas por *S. aureus* e 26,9% dessas apresentaram amostras resistentes à meticilina. A prevalência de MRSA entre todas as crianças foi 15,5%
- A taxa de resistência a eritromicina foi elevada, tanto entre as amostras de *S. aureus* (53%) quanto entre amostras SCN (75%).
- A prevalência observada dos tipos de *SCCmec* foi vista pela predominância do tipo *SCCmec* IV (71,43%), sendo preditivo dizer que a maioria das amostras MRSA tinha origem comunitária.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, Carlos; LABARCA, Jaime; SALLES, Mauro. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 107-108, 2010.

ALVES, Maria de Fatima N. F., *et al.* First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2175-2179, 2020.

ARALI, Sagar M. *et al.* Prevalence and antibiotic susceptibility profile of MRSA isolated from the Anterior Nares of school going children in Gulbarga. **International Journal of Medical Science and Public Health**, v. 5, n. 04, p. 1, 2016.

BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n 19, p.145-176, outubro, 1990.

BANNERMAN, T. L. & PEACOCK, S. J. *Staphylococcus*, Micrococcus and other catalase-positive cocci. **Manual of Clinical Microbiology: Volume 1**, n. Ed. 9, p. 390-411, 2006.

BHATTA, Dharm R. *et al.* Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2016.

BONFIM, Caroline M. *et al.* Patógenos respiratórios frequentes em casos de infecções do trato respiratório em crianças de creche. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 5, p. 439-444, 2011.

BRAGA, Eneida Dias Vianna *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, 2014.

CHAVAKIS, Triantafyllos *et al.* *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. **Thrombosis and haemostasis**, v. 94, n. 08, p. 278-285, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *In*: Abstract of the 15th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute document. M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5), Wayne, Pennsylvania, USA, 2007.

COOKE, Fiona J.; BROWN, Nicholas M. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Br Med Bull**, v. 94, n. 1, p. 215-227, 2010.

DE CARVALHO, Suzi P. *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, 2017.

DE MIRANDA, O. P. *et al.* Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, n. 12, p. 1165-1172, 2007.

DIBAJ, Ramin *et al.* Study of prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and CA-MRSA nasal colonization in 2-5 years old children in Isfahan. **Iranian Journal of Medical Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 22-30, 2014.

ELSTON, Dirk M. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 1-16, 2007.

ENRIGHT, Mark C. *et al.* Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1008-1015, 2000.

ENRIGHT, Mark C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7687-7692, 2002.

ESPOSITO, Susanna *et al.* Oropharyngeal and nasal *Staphylococcus aureus* carriage by healthy children. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2014.

FORCADE, Nicolas A. *et al.* Prevalence, severity, and treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) skin and soft tissue infections in 10 medical clinics in Texas: a South Texas Ambulatory Research Network (STARNet) study. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 24, n. 5, p. 543-550, 2011.

FRANCO, J. M. P. L. *et al.* O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Rev. Semana Acadêmica. Fortaleza**, v. 1, n. 72, p. 1-17, 2015.

FRAZEE, Bradley W. *et al.* High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. **Annals of emergency medicine**, v. 45, n. 3, p. 311-320, 2005.

FREDHEIM, E. G. A. *et al.* Colonisation and interaction between *S. epidermidis* and *S. aureus* in the nose and throat of healthy adolescents. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 123-129, 2015.

GABRIEL, Luiza Resende Lara. **Resistência plasmidial do tipo AmpC na família Enterobacteriaceae e métodos de detecção laboratorial**. 2018. Trabalho de conclusão de curso em Biomedicina, Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), Brasília, 2018.

GARCÍA-GARROTE, Fernando *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 45-50, 2014.

GELATTI, Luciane Cristina *et al.* *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina: disseminação da comunidade emergente. **A. Bras. Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, p. 501-506, out. 2009.

GENDREL, Dominique *et al.* Fluoroquinolones in pediatrics: a risk for the patient or for the community?. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 9, p. 537-546, 2003.

GERHARDTS, A. *et al.* Fabric-skin models to assess infection transfer for impetigo contagiosa in a kindergarten scenario. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 6, p. 1153-1160, 2015.

GLATTHARDT, Thaís *et al.* Small molecules produced by commensal *Staphylococcus epidermidis* disrupt formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 5, 2020.

GORDON, Rachel J.; LOWY, Franklin D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement\_5, p. S350-S359, 2008.

GRICE, Elizabeth A.; SEGRE, Julia A. The skin microbiome. **Nature reviews microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244-253, 2011.

GUPTA, Alok *et al.* Incidence, risk stratification, antibiogram of pathogens isolated and clinical outcome of ventilator associated pneumonia. **Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 15, n. 2, p. 96, 2011.

HIROSE, Mina *et al.* Prevalence and genetic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from oral cavity of healthy children in Japan. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 400-407, 2019.

HO, Pak-Leung *et al.* Molecular epidemiology and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* among young children attending day care centers and kindergartens in Hong Kong. **Journal of Infection**, v. 64, n. 5, p. 500-506, 2012.

II SEMINÁRIO NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES EM SERVIÇO DE SAÚDE, 2008, São Paulo. Interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. 2008. 71 p. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicos/IIseminario\\_2008/interpretacaodeantibiograma\\_antoniachado.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicos/IIseminario_2008/interpretacaodeantibiograma_antoniachado.pdf). Acesso em: 28 abr. 2021.

JAMALUDDIN, Tengku Zetty Maztura Tengku *et al.* Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3778-3783, 2008.

JERASSY, Z. *et al.* Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, n. 2, p. 230-236, 2006.

JOURDAIN, S. *et al.* Differences in nasopharyngeal bacterial carriage in preschool children from different socio-economic origins. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 6, p. 907-914, 2011.

JUDA, Marek; CHUDZIK-RZAD, Beata; MALM, Anna. The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 155-160, 2016.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, 2000.

KATEETE, David Patrick *et al.* Species and drug susceptibility profiles of *staphylococci* isolated from healthy children in Eastern Uganda. **PloS one**, v. 15, n. 2, p. e0229026, 2020.

KLUYTMANS, J. A. J. W.; WERTHEIM, H. F. L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, n. 1, p. 3-8, 2005.

KLUYTMANS, Jan; VAN BELKUM, Alex; VERBRUGH, Henri. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008. 1465 p.

LADHANI, Shamez.; GARBASH, Mehdi. *Staphylococcal* Skin Infections in Children. **Pediatr. Drugs**, v. 7, n. 2, p. 77-102, 2012.

LAMARO-CARDOSO, Juliana *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, 2009.

LEBON, A. *et al.* Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 1995–1996, 2010.

LEE, Jina *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* obtained from the anterior nares of healthy Korean children attending daycare centers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e558-e563, 2011.

LOWY, Franklin D. *et al.* Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MCDUGAL, Linda K. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113-5120, 2003.



MILHEIRIÇO, Catarina; OLIVEIRA, Duarte C.; DE LENCASTRE, Hermínia. 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, 2007.

MILLER, Loren G. et al. Clinical and epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 4, p. 471-482, 2007.

MILLER, Melissa B. et al. Prevalence and risk factor analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in children attending child care centers. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1041-1047, 2011.

MIMICA, Marcelo J.; MENDES, Caio M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MORITZ, Erin D. et al. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from employees, children, and environmental surfaces in Iowa child daycare facilities. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 5, p. 482-488, 2015.

NASCIMENTO, Thiago César et al. Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 415-419, 2009.

NESTI, Maria M. M.; GOLDBAUM, Moisés. Infectious diseases and daycare and preschool education. **Jornal Pediatria (Rio Janeiro)**, v. 83, n. 4, p. 299-312, 2007.

NICOLA, Federico G. et al. Characterization of erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* recovered in the United States from 1958 through 1969. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 3024-3027, 1998.

PAN, Hui et al. Nasal carriage of common bacterial pathogens among healthy kindergarten children in Chaoshan region, southern China: a cross-sectional study. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2016.

PATERNINA-DE LA OSSA, Rolando 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, 2018.

PEDRAZA, Dixis Figueroa; QUEIROZ, Daiane de; SALES, Márcia Cristina. Doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 2, p. 511-528, 2014.

PEREIRA, Alessandra da Silva; LANZILLOTTI, Haydée Serrão; SOARES, Eliane de Abreu. Frequência à creche e estado nutricional de pré-escolares: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 4, p. 366-372, 2010.

REGEV-YOCHAY, Gili *et al.* Parental *Staphylococcus aureus* carriage is associated with *staphylococcal* carriage in young children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 11, p. 960-965, 2009.

RESI, D.; MILANDRI, M.; MORO, M. L. Antibiotic prescriptions in children. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 282-286, 2003.

ROCHE, Fiona M. *et al.* Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. **Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 643-654, 2003.

RODRÍGUEZ, Erika A. *et al.* Differences in epidemiological and molecular characteristics of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* (MSSA-MRSA) in children from a university hospital and day care centers. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101417, 2014.

SEDIGHI, Iraj; MOEZ, Hoda; ALIKHANI, Mohammad. Nasal carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and their antibiotic susceptibility patterns in children attending day-care centers. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 58, n. 3, p. 227-234, 2011.

STACH, Christopher S.; HERRERA, Alfa; SCHLIEVERT, Patrick M. *Staphylococcal* superantigens interact with multiple host receptors to cause serious diseases. **Immunologic research**, v. 59, n. 1-3, p. 177-181, 2014.

TAVARES, Débora A. *et al.* Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2010.

TENOVER, Fred C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

VANDENESCH, François; LINA, Gérard; HENRY, Thomas. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 12, 2012.

VAZ, Louise Elaine *et al.* Recent trends in outpatient antibiotic use in children. **Pediatrics**, v. 133, n. 3, p. 375-385, 2014.

VIVONI, A. M., DIEP, B. A., DE GOUVEIA MAGALHAES, A. C., SANTOS, K. R., RILEY, L. W., SENSABAUGH, G. F., *et al.* Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1686-1691.

WERTHEIM, Heiman F. L. *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WHITE, D. G. *et al.* A comparison of six selective media for the enumeration and isolation of *staphylococci*. **Journal of food protection**, v. 51, n. 9, p. 685-690, 1988.

WILLIAMS, Gabrielle; CRAIG, Jonathan C. Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, 2019.

ZILBERBERG, Marya D. *et al.* Hospitalizations with healthcare-associated complicated skin and skin structure infections: Impact of inappropriate empiric therapy on outcomes. **Journal of hospital medicine**, v. 5, n. 9, p. 535-540, 2010.

ZIMERMAN, Ricardo Ariel. Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana. BRASIL. Ministério da Saúde. Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados. Brasília: **Ministério da Saúde**, p. 1-12, 2010.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1



### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado responsável,

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa **“Investigação da colonização por *Staphylococcus spp.* em crianças em idade pré-escolar”**. Antes de decidir se seu filho(a) participará, é importante que você entenda por que o estudo está sendo feito e o que ele envolverá. Faça perguntas se algo não estiver claro ou se quiser informações. Não tenha pressa de decidir se deseja ou não que seu filho(a) participe deste estudo. A Universidade Federal do Rio de Janeiro/Campus Macaé está pesquisando a ocorrência de *Staphylococcus*, uma bactéria que pode causar infecções em crianças pequenas que frequentam escolas. Para isso, será necessário utilizar um cotonete macio que será passado levemente na entrada do nariz, o que não causará dor. Esse cotonete será estudado em um laboratório.

Os riscos dessa pesquisa envolvem um possível incômodo causado pelo cotonete. Se você aceitar que seu filho (a) participe, contribuirá para que possamos entender como as bactérias se espalham no ambiente escolar. Você é quem decide se seu filho(a) participará ou não deste estudo. Se decidir deixá-lo(a) participar, você deverá assinar este termo de consentimento. Você tem a liberdade de retirar seu filho(a) do estudo a qualquer momento e sem dar justificativas. Nada ocorrerá se o seu filho(a) não participar. Isso não afetará em nada o padrão de cuidados que ele(a) receberá na escola.

O estudo está de acordo com o estabelecido na Resolução do CNS 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988. Este estudo foi revisado pelo seguinte Comitê de Ética em Pesquisa: Nome: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro/Campus Macaé. Endereço: Rua

Aloísio da Silva Gomes, 50 - Granja dos Cavaleiros, Macaé – Sala 106 - Bloco B. Em caso de dúvidas ou necessidade, o responsável poderá entrar em contato com a Prof. Dra. Fernanda Sampaio Cavalcante (Universidade Federal do Rio de Janeiro/Campus Macaé), pelo telefone (21) 99974-7620 ou pelo email fernanda@macae.ufrj.br. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, entre em contato pelo telefone e/ou email acima. Nenhum incentivo ou recompensa financeira está previsto pela participação de seu filho(a) neste estudo. Você também não terá quaisquer custos ou despesas pela sua participação nessa pesquisa, mas será ressarcido caso a participação na pesquisa gere alguma despesa. Você será indenizado e receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de danos decorrentes da pesquisa.

Obrigado por ler estas informações! Você está recebendo duas cópias deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se desejar que seu filho(a) participe deste estudo, você deve assinar ambas as cópias e devolver uma delas na agenda da criança. A outra cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você deverá armazenar para o seu próprio registro.

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do projeto: "Investigação da colonização por *Staphylococcus* spp. em crianças em idade pré-escolar"**

Nomes dos investigadores: Dra. Fernanda Cavalcante e Dra. Maria Christina Verdam

1 - Confirmando que li e entendi a folha de informações para o estudo acima e que tive a oportunidade de fazer perguntas.

2 - Entendo que a participação de meu (minha) filho(a) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, é voluntária e que sou livre para retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar dar explicações.

3 - Concordo que meu (minha) filho (a) participe deste estudo.

Nome da mãe/responsável legal

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### QUESTIONÁRIO

#### Pontos do questionário

- ***Acesso ao cuidado em saúde***
- ***Relato de uso de antibiótico (frequência, e qual foi a última vez)***
- ***Recorrência de infecções***
- ***Já esteve internado para algum procedimento ou por alguma doença***
- ***Tem alguma doença crônica***

O questionário foi aplicado aos responsáveis das crianças autorizadas, que tiveram o termo de consentimento livre esclarecido assinado. A aplicação foi realizada mediante ligação, numa visita à escola que foi feito os levantamentos dos dados, onde teremos a possibilidade de traçar uma futura relação entre os achados laboratoriais com a clínica apresentada pelas crianças.

#### Perguntas

- 1) Seu filho ou filha já esteve internado alguma vez? Se sim, o que teve?
- 2) Usou antibiótico entre o período de 2018-2019?
- 3) Já teve alguma infecção de pele?
- 4) Na sua casa, alguém já teve infecção de pele?
- 5) Seu filho faz algum acompanhamento para alguma doença?

## ANEXO 3

### PERSPECTIVAS

Durante o estudo, foi planejado a análise do DNA cromossômico por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), entretanto, devido a pandemia do COVID-19 e problemas técnicos relacionados ao aparelho, foi adiado a realização da técnica, mas será realizado assim que possível.

A eletroforese em gel de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis – PFGE) é uma técnica de ouro para tipagem molecular de amostras microbiológicas e tem como característica de analisar perfil do DNA cromossômico das amostras e será feita pela separação dos fragmentos de DNA, utilizando a enzima de restrição SmaI, conforme o estabelecido por Vivoni e colaboradores (2006).

Inicialmente, serão selecionadas as amostras que foram caracterizadas como MRSA e essas serão semeadas em ágar sangue à 35 °C por 24h. As colônias bacterianas serão inoculadas em 5mL de caldo TSB (Oxoid) e incubadas por 2h sob agitação de 250 rpm a 35 °C, até atingir a escala 2 de McFarland ((~6,0 x 10<sup>8</sup>UFC/mL).

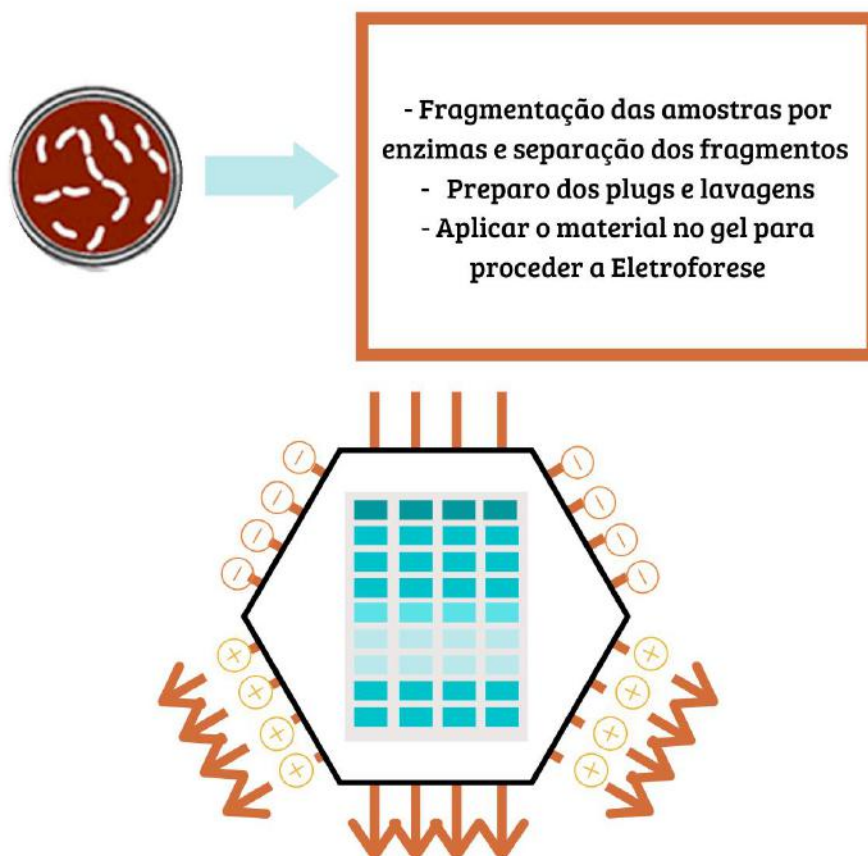
Depois, será feita a transferência de 1mL da suspensão para um tubo Eppendorf® e centrifugado (7000 X g / 5min), o sedimento suspenso será dissolvido em 250µl de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6). Nesta suspensão, será adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Heaven, EUA) a 2%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Tendo homogeneizado, a agarose será distribuída em moldes, sendo mantidos a 4°C por cerca de 10 min, que em seguida serão cortados em pequenos blocos. Logo após, os blocos de agarose serão postos em 2ml de solução de lise EC (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 100mM, 0,5% de BRIJ e 0,5% lauril sarcosinato de sódio; pH final 7,5) contendo lisozima (0,5mg/mL) e lisostafina (0,05mg/mL), nas respectivas concentrações, e incubados a 35°C mantendo agitação lenta e por 18h. Posteriormente, os tubos serão resfriados a 4°C e a solução será substituída por 2mL de solução ES [EDTA 0,4 M, pH 9,5, 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio] contendo proteinase K (0,1mg/ml) (Sigma-Aldrich Company). A solução será incubada a 50°C, em banho-maria, durante 18h. Ao final desta etapa, será feita a digestão do DNA



cromossômico, realizada um bloco de agarose contendo DNA, que será lavado quatro vezes em tampão TE a 37°C, em banho maria, na qual as três primeiras lavagens serão feitas a cada 1h e a última de 18h. Seguindo o procedimento, será transferido o bloco de agarose para uma solução de 250µl do tampão específico da enzima de restrição SmaI (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) e incubado a 25°C, por 4h. Em seguida, a solução tampão será mais uma vez removida e acrescido 250µl do tampão da enzima, desta vez contendo 20U da enzima SmaI, sendo incubada a 25°C, durante 18h. Posteriormente, a solução contendo a enzima será removida, o bloco de agarose fundido a 70°C e aplicado no gel de agarose (Invitrogen) a 1% feito em tampão TBE 0,5x. O gel será submetido à eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad, Hercules, EUA), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 s, durante 21 h, a 6 v/cm, 13°C, com ângulo de 120°. Após a corrida, o gel será corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL – agente intercalante), por 40 min e descorado por 1h em água destilada. Em seguida, no fotodocumentador (Vilber Loumat) possibilitará ter a imagem capturada sob luz ultravioleta do aparelho. O padrão de DNA utilizado será o marcador 50-1.000Kb Lambda Ladder PFGE Marker (New England BioLabs).

A análise dos fragmentos obtidos de cada amostra será realizada através do programa Bionumerics, versão 6.0 (Applied Maths, Bélgica), utilizando o coeficiente Dice de similaridade e o método de “Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages” (UPGMA) para análise dos agrupamentos. O método utilizado foi de Van Belkum e colaboradores (2009), onde é considerado que até quatro bandas de diferença e no mínimo de 80% de similaridade entre as amostras conclusão geneticamente elas são praticamente iguais.

Figura 9. Técnica padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas. PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) foi utilizada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados.



Fonte: Elaboração própria.