



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

CLÁUDIA FERNANDA AZEVEDO BRAGA ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp. E ANÁLISE DE
ASSOCIAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E MORTALIDADE EM
BACTEREMIAS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DE PERNAMBUCO**

Recife
2021

CLÁUDIA FERNANDA AZEVEDO BRAGA ALBUQUERQUE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp. E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E MORTALIDADE EM BACTEREMIAS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DE PERNAMBUCO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco como requisito à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Dra. Vera Magalhães da Silveira

Coorientadora: Dra. Cláudia Fernanda de Lacerda Vidal

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

- | | |
|-------|--|
| A345c | <p>Albuquerque, Cláudia Fernanda Azevedo Braga</p> <p>Caracterização molecular de <i>Staphylococcus</i> spp. e análise de associação clínica, epidemiológica e mortalidade em bacteremias em hospital terciário de Pernambuco / Cláudia Fernanda Azevedo Braga Albuquerque. – 2021.</p> <p>66 f.; il.</p> <p>Orientadora: Vera Magalhães da Silveira.
Coorientadora: Cláudia Fernanda de Lacerda Vidal.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021.</p> <p>Inclui referências e anexo.</p> <p>1. <i>Staphylococcus</i> Spp. 2. Bacteremia. 3. Mortalidade. 4. Características clínicas. 5. PFGE. I. Silveira, Vera Magalhães da (orientadora). II. Vidal, Cláudia Fernanda de Lacerda. (coorientadora). III. Título.</p> <p>616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2021 - 206)</p> |
|-------|--|



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

CLÁUDIA FERNANDA AZEVEDO BRAGA ALBUQUERQUE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp. E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E MORTALIDADE EM BACTEREMIAS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Aprovada em: 20/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a Líbia Cristina Rocha Vilela Moura
Área Acadêmica de Medicina
Tropical/UFPE

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo
Área Acadêmica de Medicina
Tropical/UFPE

Prof. Dr. Vinícius Pietta Perez
Departamento de Fisiologia e
Patologia/UFPB

Dedico a todos os pesquisadores brasileiros que diariamente lutam pela ciência em prol da sociedade em um país com tantas restrições.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade que me foi dada mais uma vez de contemplar Sua grandeza através da natureza.

Aos meus queridos pais por lutarem pela minha formação. Devo a eles tudo o que sou.

Ao meu amado esposo, Rafael Albuquerque, meu ponto de equilíbrio que me transforma em uma pessoa melhor.

Ao meu filho lindo: força motriz da minha vida.

À Dra Cândia Fernanda Lacerda Vidal por acreditar em mim e me lançar nesta aventura.

Ao Dr Danilo Elias Xavier por idealizar esse projeto. Seu amor pela ciência é inspirador.

À Dra Vera Magalhães da Silveira por me acolher e dizer tudo o que precisei ouvir.

Ao meu amigo Danylo Palmeira por me dar o exemplo da leveza de cursar uma pós graduação.

A Carlos Alberto das Neves pela generosidade de compartilhar comigo o fruto do seu trabalho.

A Izolda Moura (Lôra) por me mostrar sempre o bom humor das coisas.

A Andréza Gomes por todo o apoio que precisei.

Aos meus queridos amigos de turma: a companhia de vocês fez tudo valer a pena.

Aos professores do programa por me mostrarem um mundo novo.

Aos queridos da secretaria do programa, Walter e Neemias, pela disponibilidade e por transmitirem a tranquilidade que precisamos.

RESUMO

Pesquisas em análise de associação entre características moleculares e desfecho clínico em bacteremias por *Staphylococcus* spp. têm demonstrado resultados conflitantes. Estudo de corte transversal foi conduzido para avaliar associação entre características clínicas, epidemiológicas, moleculares e mortalidade em bacteremias por espécies deste gênero. Foram analisadas 44 amostras de hemoculturas positivas de pacientes de qualquer faixa etária e sexo internados em hospital terciário de Pernambuco entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos por revisão de prontuário médico. A confirmação das espécies foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF e classificação molecular em grupos por eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE). Com a técnica de PCR multiplex identificaram-se os cassetes cromossomais para presença de genes *mecA*. A análise da associação entre as variáveis foi realizada através do cálculo da razão de prevalência aplicando o teste exato de Fisher para verificação do nível de significância e considerado p valor $\leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%. Entre os óbitos (n=19), houve prevalência no sexo feminino (n=13; 68%), acima de 45 anos (n=14; 74%), dentre os quais 78% usaram cateter venoso central. Houve associação entre os óbitos e o grupo molecular D (37%; p=0,03). Embora razão de prevalência de mortalidade de 2,5 (IC 95% 1,3-4,3; p= 0,01) em portadores de neoplasia, não foi encontrada associação entre esta característica clínica e os diferentes grupos de isolados de *Staphylococcus* spp. identificados por técnica molecular de PFGE. Embora não tenha sido encontrada associação entre grupos de similaridade molecular avaliadas por PFGE e características clínicas e epidemiológicas, a mortalidade em infecções por *Staphylococcus* spp. foi significativa entre pacientes portadores de neoplasias e cateter venoso central.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp.; bacteremia; mortalidade; características clínicas; PFGE.

ABSTRACT

Research on analysis of the association between molecular characteristics and clinical outcome in bacteremias due to *Staphylococcus* spp. has shown conflicting results. A cross-sectional study was conducted to evaluate an association between clinical, epidemiological, molecular and mortality in bacteremias due to species of this genus.

Forty-four positive blood culture samples from patients of any age and gender were analyzed at a tertiary hospital in Pernambuco between January 2016 and February 2017. Clinical and epidemiological data were obtained by medical records review. The species were confirmed using MALDI-TOF mass spectrometry and molecular classification in groups by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Multiplex PCR technique, searched for chromosomal cassettes and identified the presence of *mecA* gene. The analysis of the association between the variables was performed by calculating the prevalence ratio and applied Fisher's exact test to verify the significance level and considered p value ≤ 0.05 with a 95% confidence interval. Among deaths (n=19), 78% of the patients used central line and female group represented 68% (n=13) of the total. The median age was 53 years. There was an association between deaths and molecular group D (37%; p=0.03). Although a mortality prevalence ratio of 2.5 (95% CI 1.3-4.3; p= 0.01) in patients with cancer, no association was found between this clinical characteristic and the different groups of *Staphylococcus* spp. isolates identified by PFGE technique. Although no association was found between groups of molecular similarity evaluated by PFGE technique and clinical and epidemiological characteristics, mortality due to *Staphylococcus* spp. bacteremia was significant among patients with cancer and central lines.

Keywords: *Staphylococcus* spp.; bacteremia; mortality; clinical characteristics; PFGE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente.	15
Figura 2 – <i>Staphylococcus aureus</i> em coloração de Gram.	15
Figura 3 – Tipos de SCCmec.	19
Figura 4 – Identificação de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de hemoculturas de pacientes internados em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	26

ARTIGO

Figura 5 – Dendograma com padrões de bandas obtidas por PFGE para isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> . em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	38
Figura 6 – Dendograma com padrões de bandas obtidas por PFGE para isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	38

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com infecções de corrente sanguínea em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	37
Tabela 2 – Prevalência de <i>Staphylococcus</i> spp. quanto a tipagem molecular em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	39
Tabela 3 – Comparação clínica, epidemiológica, moleculares com o desfecho clínico das infecções de corrente sanguínea por <i>Staphylococcus</i> spp. em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	40
Tabela 4 – Comparação das características clínico epidemiológicas e tipagem molecular nas infecções de corrente sanguínea por <i>Staphylococcus</i> spp. em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BEC – Clone Endêmico Brasileiro

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CC – Complexo clonal

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

ICS – Infecção de corrente sanguínea

MDR – Multidrogarresistente

MLST – Tipagem molecular multilocus

MRSA – *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

MSSA - *Staphylococcus aureus* meticilino sensível

NHSN - *National Healthcare Safety Network*

PFGE – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

SAME - Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SCC*mec* – Cassete Cromossomal Estafilocócico *mec*

S*CoN* – *Staphylococcus* coagulase negativo

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA.....	14
2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.....	15
2.3	MECANISMO DE RESISTÊNCIA	16
2.4	INFECÇÕES POR <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	19
2.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.....	20
3	HIPÓTESE	22
4	PERGUNTA CONDUTORA.....	23
5	OBJETIVOS.....	24
5.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
6	MATERIAIS E MÉTODOS	25
6.1	DESENHO DO ESTUDO	25
6.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO	25
6.3	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	25
6.4	DEFINIÇÃO DE TERMOS.....	25
6.5	ISOLADOS BACTERIANOS.....	25
6.6	CATEGORIZAÇÃO DE VARIÁVEIS.....	27
6.6.1	Variáveis independentes.....	27
6.6.1.1	Aspectos clínicos epidemiológicos	27
6.6.1.2	Aspectos microbiológicos.....	29
6.6.2	Variáveis dependentes	30
6.7	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS.....	30
7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	32
8	RESULTADOS.....	33
8.1	ARTIGO CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E MORTALIDADE EM BACTEREMIAS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DE PERNAMBUCO.....	33
9	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICE A – ARTIGO.....	52

1 INTRODUÇÃO

Com o desafio imposto pela resistência antimicrobiana, a necessidade de novos antimicrobianos e implementação de ação global para controle de patógenos resistentes, em 2016 a Organização Mundial de Saúde desenvolveu uma lista de patógenos prioritários com resistência antimicrobiana. No grupo de prioridade alta (grupo 2) encontram-se, dentre outros, *Staphylococcus aureus* metilino resistentes (MRSA) (WHO, 2017).

Em 2017, estimou-se que 10600 pacientes evoluíram para óbito por infecções causadas por MRSA nos Estados Unidos, mas embora redução de 21% destas infecções, o CDC classifica estes patógenos como sérias ameaças em relatório de resistência antimicrobiana. (CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019)

Em infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* estudos com pesquisa de fatores relacionados ao hospedeiro como idade avançada e comorbidades observaram risco de falha terapêutica, recorrência da infecção ou mortalidade (Recker, 2017) (Szubert, 2019). Dentre as diferentes espécies e espectros de patogenicidade, Heilmann et al. cita relação entre imunossupressão e uso de dispositivos invasivos com desfecho clínico em infecções por *Staphylococcus coagulase negativo* (ScoN) (Heilmann, 2018). A análise molecular destes patógenos trouxe elucidações quanto à presença de fatores de virulência, produção de biofilmes ou mecanismos de escape aos efeitos do sistema imune contribuindo para determinação de desfecho de infecção (Recker, 2017). Características moleculares quanto à presença de genes de resistência e complexos clonais de *Staphylococcus* spp. poderiam apresentar correlação com aspectos clínicos epidemiológicos de pacientes com bacteremia e prever desfecho clínico.

Coorte prospectiva de pacientes com bacteremia por *S aureus* foi realizada na América Latina com a participação de nove países mostrando a substituição do clone endêmico brasileiro (BEC) pela linhagem USA 100 (Arias, 2017). Entretanto, este estudo não avaliou a relação clínico epidemiológica destes pacientes com a tipagem molecular das cepas prevalentes. Bolmfeldt *et al.* (Blomfeldt, 2016) em estudo populacional prospectivo na Noruega descreveram características epidemiológicas, clínicas, desfecho para infecções de corrente sanguínea por *S aureus* além de analisar associação entre linhagens clonais de *S aureus* e mortalidade. Encontraram associação entre o genótipo CC30 e mortalidade. (Blomfeldt, 2016) Sit *et al.* (2018) (Sit, 2018) avaliaram características clínicas, fenotípicas quanto a testes de sensibilidade antimicrobiana e genotípicas para pulsotipos, complexos clonais e presença de cassetes carreadores de genes de resistência e fatores de virulência em bacteremias por *S*

aureus meticilino resistentes (MRSA) investigando fatores de risco para mortalidade em estudo de coorte retrospectivo realizado em hospital terciário de ensino na Malásia. Entretanto, os resultados não mostraram correlação estatisticamente significativa entre características fenotípicas, genotípicas e mortalidade. (Sit, 2018)

Heilmann descreve a capacidade de formação de biofilmes por *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) relacionada à presença de genes envolvidos na adesão, maturação e disseminação destas estruturas complementando os achados de correlação entre manutenção de dispositivos invasivos e pior desfecho clínico em bacteremias por estes patógenos. (Heilmann, 2018) (Park, 2015)

Através de estudo de amostra por conveniência de isolados de *Staphylococcus* spp. em hemocultura, analisou-se a associação entre características moleculares destas espécies e clínico-epidemiológicas em hospital terciário público da cidade do Recife entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA

Infecção de corrente sanguínea (ICS) é caracterizada pela presença de um microrganismo em uma ou mais hemoculturas a qual provoca resposta inflamatória (Lisowska-Lysiak, 2021). Pode ser relacionada à assistência a saúde com início em ambiente hospitalar quando identificada a partir de 48h de internação, relacionada a assistência a saúde com início na comunidade quando identificada com menos de 48h de internamento com presença de fatores de risco para infecção hospitalar ou associada à comunidade quando fatores de risco de infecção hospitalar estão ausentes (Wang, 2015).

Representa a segunda causa principal de infecções relacionadas a assistência à saúde no Brasil com densidade de incidência de 4/1000 pacientes com cateter central-dia em UTI adulto no país. Dados norte americanos apontam redução de 50% das infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateter venoso central entre os anos de 2008 e 2014 graças a implementação de medidas de prevenção e boas práticas corroborando para as características preveníveis (Novosad, 2020). Apesar disso, aproximadamente 24.000 casos destas infecções foram notificados no ano de 2017 nos EUA o que reforça a importância de medidas contínuas de prevenção visto que representam importante causa de morbidade e mortalidade variando de 30 a 60% em pacientes portadores de comorbidades severas e internados em unidades de terapia intensiva respectivamente. (Santoro, 2020) . Um índice muito utilizado como preditor de risco para mortalidade em bacteremias é o Score Pitt. Este score pode ser aplicado em doenças infecciosas por *Candida* spp., Gram-negativos assim como para Gram-positivos. Desenvolvido e modificado por pesquisadores da Universidade de Pittsburg, pode variar entre 0 e 14 pontos onde a pontuação ≥ 4 indica maior risco para mortalidade. (Henderson, 2019) (Al-Hasan, 2020).

Os principais agentes causadores destas infecções em UTIs adulto no Brasil em 2019 foram *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) (25%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (18%) e *Staphylococcus aureus* (14%). Perfil microbiológico semelhante foi encontrado em UTIs da Europa em 2017 conforme relatório anual com a diferença que *Enterococcus* spp. ocupou segundo lugar em frequência das ICS e *Staphylococcus aureus*, quarto lugar (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019). Entre as ICS nas UTIs brasileiras por patógenos Gram-positivos, 41% foram causadas por *Staphylococcus* coagulase negativo

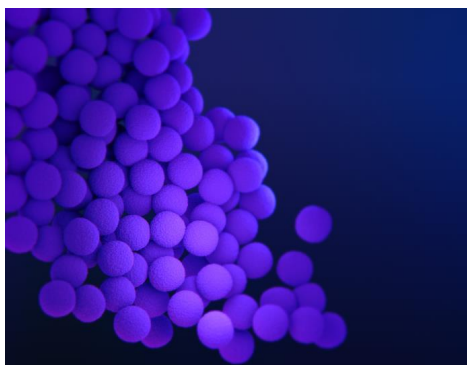
(SCoN) com mais de 70% destas cepas resistentes a oxacilina e 33 % causadas por *Staphylococcus aureus* com 59% destas amostras resistentes a oxacilina (ANVISA, 2020).

Infecções por estafilococos impactam o mundo inteiro e não somente países em desenvolvimento, podendo apresentar uma prevalência de 24-79% dos isolados nas infecções de corrente sanguínea. Os principais fatores de risco para bacteremias por estafilococos são uso de dispositivos invasivos, extremos de idade, presença de comorbidades e imunossupressão (Lisowska-Lysiak, 2021).

2.2 *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

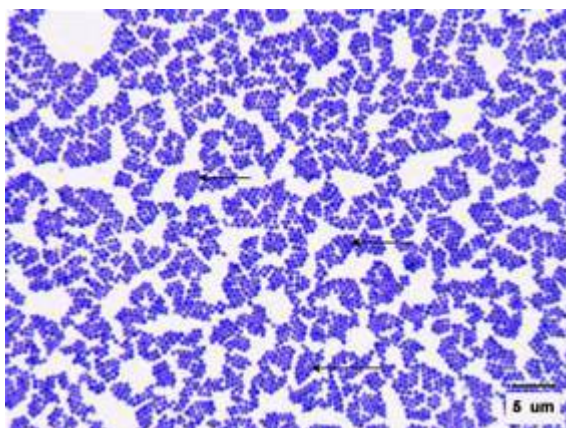
O gênero *Staphylococcus* representa grupo de microrganismos cocos (ANVISA, 2020) encontrados isoladamente ou aos pares podendo também ser vistos em formato de cadeia ou em formação em conjunto. Ogston introduziu a denominação *Staphylococcus*, do grego staphylé, que pode ser traduzido como cacho de uva (Figura 1). Possuem espessa camada de peptidoglicano na composição de sua parede celular (90%) a qual pode ser corada em violeta quando aplicado método de Gram para caracterização fenotípica bacteriana (Smith & Hussey, 2005), ilustrado na Figura 2. São agentes imóveis, não formadores de esporos e podem ser divididos em dois grupos de acordo com a produção de enzimas extracelular coagulase: estafilococos coagulase-positiva e estafilococos coagulase-negativa (SCoN) (Bennett, 2015). O primeiro grupo é representado por patógenos oportunistas dentre os quais inclui-se *Staphylococcus aureus* e o segundo grupo é representado por cerca de 40 espécies e subespécies dos quais os mais associados a infecções em humanos são *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* e *S. haemolyticus*.

Figura 1 – *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.



Fonte: CDC (2013).

Figura 2 – *Staphylococcus aureus* em coloração de Gram.



Fonte: StatPearls Publishing LLC (2021).

Estes microrganismos comumente colonizam a pele e mucosas em humanos e podem causar infecções em diversos sítios como pele, ossos, trato urinário, sistema nervoso central, pulmões e corrente sanguínea.

As espécies de *S aureus* apresentam genes codificadores de adesinas e toxinas envolvidos no processo de colonização e manifestações infecciosas, conferido maior virulência quando comparado com infecções por SCoN. Entretanto, a capacidade de formação de biofilmes, principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, é um dos fatores de virulência mais importantes destas espécies. Não obstante, estudos têm revelado infecções graves por SCoN particularmente em neonatos, imunossuprimidos e usuários de dispositivos invasivos (Network, 2021).

2.3 MECANISMO DE RESISTÊNCIA

Mecanismos diferentes, concomitantes ou não, de resistência aos antimicrobianos podem estar presentes em bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* spp. Sendo a parede celular destas bactérias uma espessa camada formada por peptidoglicano, esta estrutura tem importante função para o processo de divisão celular bem como para o equilíbrio osmolar com o meio ambiente evitando lise celular (Tavares, 2014). Esta parede é alvo de ação dos antimicrobianos notadamente beta lactâmicos e glicopeptídeos os quais inibem a produção desta barreira celular desencadeando efeito bactericida. Os principais mecanismos de resistência antimicrobiana encontrados em bactérias Gram-positivas são espessamento de parede celular, modificação de alvo de ação dos antimicrobianos, bombas de efluxo e produção de enzimas (ŞebnemYılmaz, 2017).

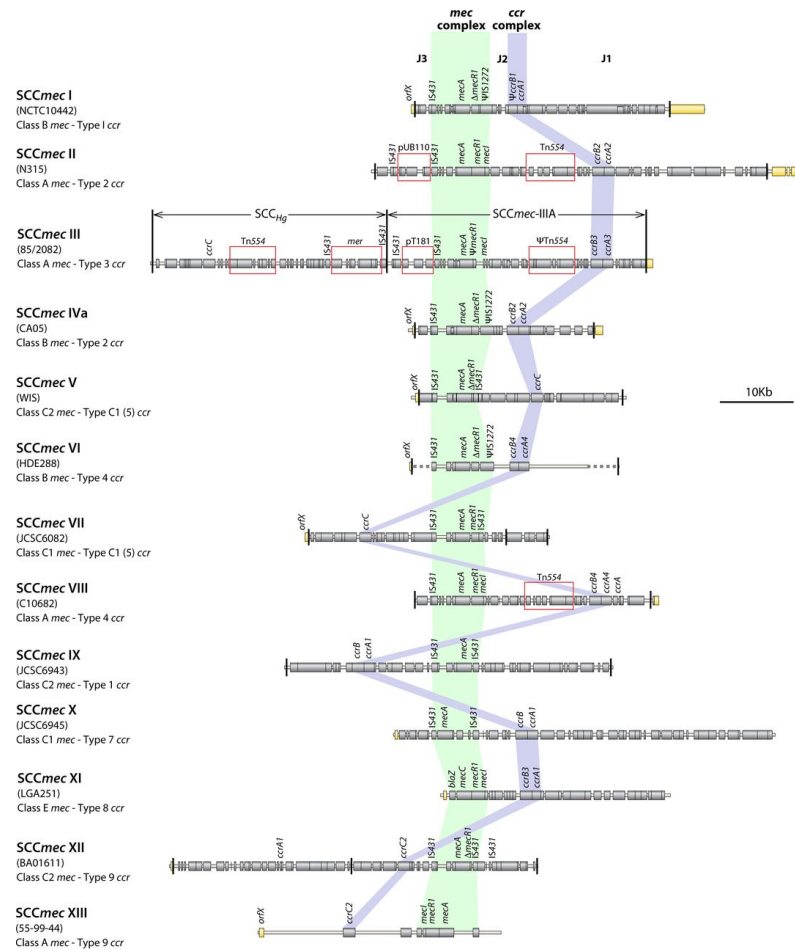
Um modelo de resistência antimicrobiana muito estudado e documentado baseia-se na resistência a meticilina por estafilococos. Após a descoberta em 1928 da penicilina por Alexander Fleming, seu uso foi liberado em larga escala na segunda Guerra mundial no tratamento clínico de soldados feridos com relatos dos primeiros casos de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina devido a produção enzimática em 1942. Em contrapartida, inicia-se na década de sessenta a produção de penicilinas semissintéticas resistentes a penicilinases como a meticilina e oxacilina. Como forma adaptativa, estafilococos adquiriram genes de resistência a meticilina e outros beta lactâmicos através de cassetes cromossomais estafilocócicos (SCC*mec*). Os cassetes cromossomais são elementos genéticos móveis compostos por um complexo de estruturas genéticas responsáveis pela sua classificação em tipos e subtipos. Atualmente são descritos 13 tipos de SCC*mec* (I-XIII), como pode ser visto na Figura 3. Três elementos básicos estão presentes no SCC*mec*: o complexo gene *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC*, *mecD*, *mecE*), complexo gene *ccr* e zonas de junção. O gene *mecA* é muito disseminado entre espécies de estafilococos e codifica uma proteína ligadora de penicilina com menor afinidade aos beta lactâmicos conferindo resistência a toda classe exceto ceftarolina e ceftobiprole. Este mecanismo representa a principal forma de resistência a meticilina responsável pelo surgimento de cepas MRSA causadoras de infecções não somente relacionada à assistência à saúde mas também em infecções adquiridas na comunidade.

Infecções por MRSA foram relacionadas a ambientes hospitalares (HA-MRSA) no final da década de 60 associando os casos a fatores de riscos como internamento ou cirurgias recentes, uso de dispositivos invasivos, hemodiálise (Barrett, McGehee, & Finland, 1968) (Brumfitt & Hamilton-Miller, 1989) . O CDC introduz a definição de MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) em infecções causadas por *Staphylococcus aureus* em pacientes sem fatores de risco presentes nos casos de HA-MRSA (Buck, et al., 2005) . Apesar disso, com o aumento da prevalência de isolados de CA-MRSA em ambientes hospitalares reforça-se a importância da análise molecular destes microrganismos para caracterização epidemiológica (Tickler, Goering, Mediavilla, Kreiswirth, & Tenover, 2017) (Lakhundi S, 2018) . Enquanto HA-MRSA tem sido descritos como principais agentes causadores de infecções de corrente sanguínea relacionadas a assistência a saúde, CA-MRSA são descritos como causadores de infecções de pele e partes moles e pneumonias graves em pacientes jovens e sem fatores de risco para infecções relacionadas a assistência à saúde. A presença de SCC*mec* tipos IV e V confere aos CA-MRSA fenótipo de resistência microbiana de menor espectro por carregarem apenas o gene *mecA* o que difere dos HA-MRSA nos quais podem ser encontrados SCC*mec* tipos I e III conferindo resistência a beta lactâmicos e não beta lactâmicos (Lakhundi S, 2018).

Além disso CA-MRSA apresentam importantes fatores de virulência, dos quais destaca-se a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) causadora de lise leucocitária relacionando-se a formação de abscessos e pneumonias necrotizantes (Otto, 2010).

Com o aumento da prevalência de MRSA e uso em maior escala de glicopeptídeos como opções terapêuticas, foi descrito em 1997 pela primeira vez *S. aureus* com suscetibilidade intermediária a vancomicina (VISA) e em 2002 o primeiro caso de resistência a vancomicina (VRSA) (Shariati, et al., 2020). Hiramatsu, por sua vez, descreve em 1997 o conceito de resistência heterogênea a vancomicina (hVISA) como um estágio precursor para resistência intermediária onde subpopulações de células (uma em cada 10^5 - 10^6) apresentam níveis variados de suscetibilidade a vancomicina (Hiramatsu, et al., 1997). Alterações genéticas no metabolismo e na estrutura da parede celular encontrada em cepas hVISA/VISA são responsáveis pela resistência aos glicopeptídeos. De forma geral ocorre um espessamento da parede celular associada a uma diminuição das ligações cruzadas entre as cadeias do peptidoglicano com maior exposição do sítio de ligação destes antimicrobianos na camada mais externa da parede celular, impedido o alcance destes antimicrobianos até a membrana celular (Mirza, 2017). Diferentemente, a resistência em isolados VRSA se dá com a aquisição do gene *vanA* através da transferência horizontal do transposon *Tn1546* presente em *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina permitindo a síntese de peptidoglicanos modificados com afinidade reduzida para este glicopeptídeo (Mirza, 2017) (Yushchuk, Binda, & Marinelli, 2020).

Figura 3 – Tipos de SCCmec.



Fonte: Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2018.

2.4 INFECÇÕES POR *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

Colonização e/ou infecção prévia por MRSA, doença renal crônica, internamento hospitalar ou cuidados com a saúde intradomiciliares representam fatores de riscos para infecções por MRSA. Fatores multivariados como idade, comorbidade, resistência a oxacilina foram citados como fatores de risco para mortalidade por ICS por MRSA (Blomfeldt et al.). Além do impacto na morbimortalidade, os custos estimados para estes eventos com alto potencial preventivo ficam em torno de 7.906 a 89.866 dólares americanos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). Nos Estados Unidos o custo hospitalar com estas infecções ficou em torno de 1,7 bilhões de dólares americanos em 2017. (CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States , 2019). Desta forma, terapia precoce oferece melhor chance de resposta clínica desde que direcionada conforme perfil de sensibilidade bacteriana (Wi, 2018) (Park, 2015).

Relatório norte americano do CDC sobre ameaça de resistência antimicrobiana, mostra queda anual estimada de 17% nas infecções de corrente sanguínea por MRSA entre 2005 e 2016 sem mudanças significativas na taxa de prevalência de bacteremias causadas por MRSA entre 2018 e 2019 conforme Relatório Nacional de infecções Relacionadas a Assistência em Saúde de 2019. (CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States , 2019) (Division of Healthcare Quality Promotion, 2021). Outros países como França e Inglaterra também têm relatado queda na incidência de ICS por MRSA resultante de medidas preventivas para infecções por MDR como uso racional de antimicrobianos, instituição de pacotes de medidas de inserção e manutenção de cateteres vasculares bem como rastreio para descolonização (Rodrigo E. Mendes, 2018).

Apesar de considerados patógenos de baixa virulência e os dados para mortalidade associada infecção de corrente sanguínea por estafilococos coagulase negativa (SCoN) serem conflitantes, o uso de dispositivos invasivos, presença de neutropenia e valores maiores para score Pitt de bacteremia parecem se relacionar com piores desfechos (Park, 2015). Além disso SCoN representam importante reservatório de elementos genéticos móveis contendo informações para resistência antimicrobiana ou ao sistema imune e fatores de virulência.

2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

A biologia molecular tem contribuído na caracterização genotípica bacteriana trazendo o conhecimento de características quanto a virulência, resistência antimicrobiana com produção de biofilmes bem como a possibilidade de avaliar prevalência local de grupos geneticamente similares e análise de disseminação clonal entre diferentes regiões. Linhagens de espécies resistentes a metilina podem ser identificadas por métodos moleculares como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e tipagem por cassete cromossomal estafilocócico (SCC*mec*) possibilitando análise epidemiológica e rastreio de surtos. (Lakhundi S, 2018).

A técnica de PFGE é um exemplo utilizado para análise epidemiológica notadamente em âmbito local (Cookson, 2007). Consiste na separação de grandes moléculas de DNA por uma enzima após a lise de células bacterianas embebidas em placa de agarose e submetida a um campo elétrico alternado entre eletrodos distintos. As imagens em gel obtidas são analisadas por software, é feita a interpretação conforme padrões encontrados e analisados a relação clonal (B.K., 2015). De acordo com Tenover, quatro categorias podem ser utilizadas como critérios de interpretação na análise epidemiológica de isolados por PFGE: padrão

indistinguível, relacionado, possivelmente relacionado ou não relacionado. (Tenover, 1995; Lisowska-Lysiak, 2021)

Com o advento da tipagem sequencial multi locus (MLST) no ano 2000, foi possível realizar sequenciamento genético com maior poder discriminatório de cepas bacterianas com classificação em diferentes complexos clonais. Utilizando estas técnicas, Arias descreveu epidemiologia molecular e filogenética de bacteremias por *Staphylococcus aureus* em estudo multicêntrico realizado em nove países da América Latina. Concluiu que a substituição clonal é comum e que é importante a identificação de novas linhagens de espécies para contribuir na definição de abordagens terapêutica específicas para infecções por MRSA. (Arias, 2017)

A partir de então alguns estudos foram realizados com o objetivo de analisar correlação entre os diferentes tipos clonais e desfecho clínico (David, 2019). Souli et al. avaliaram a prevalência epidemiológica e o impacto do tipo clonal no desfecho clínico e complicações em bacteremias por MRSA e MSSA. Foi identificado que a cepa USA300 (MLST CC8) foi associada a infecções mais complicadas (Souli M, 2019). Estudo realizado em Atlanta mostrou risco aumentado para mortalidade em infecções de corrente sanguínea por esta cepa, diferentemente do que foi relatado em estudo canadense (RR, 2010) (AE, 2016).

Análise de sequenciamento genético de SCoN contribuíram para definição de fatores de virulência para estes patógenos (Argemi, 2019). Desta forma, análise de associação entre complexos clonais e características clínicas e epidemiológicas em bacteremias também pode trazer novas contribuições na terapia e medidas de prevenção de infecções por estas espécies.

3 HIPÓTESE

Existe associação entre o desfecho clínico (óbito) e características epidemiológicas (idade, sexo, comorbidades, uso de cateteres vasculares) e microbiológicas quanto ao fenótipo de resistência antimicrobiana para oxacilina e tipagem molecular nas infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. isolados em hemoculturas no período de Janeiro de 2016 a Fevereiro de 2017 em Hospital terciário de Pernambuco.

4 **PERGUNTA CONDUTORA**

Existe associação entre o desfecho clínico (óbito) e características epidemiológicas (idade, sexo, comorbidades, uso de cateteres vasculares) e microbiológicas quanto ao fenótipo de resistência antimicrobiana para oxacilina e tipagem molecular nas infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. isolados em hemoculturas no período de Janeiro de 2016 a Fevereiro de 2017 em Hospital terciário de Pernambuco?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a existência de associação entre desfecho clínico (óbito), características epidemiológicas (idade, sexo, comorbidades, uso de cateteres vasculares) e microbiológicas quanto ao fenótipo de resistência antimicrobiana para oxacilina e tipagem molecular para a presença de genes de resistência *mecA* e tipos clonais identificados por PFGE nas infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. em hospital terciário de Pernambuco entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os casos de infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. quanto aos aspectos epidemiológicos para idade, sexo, comorbidades, uso de cateteres vasculares.
- Avaliar prevalência de *Staphylococcus* spp. quanto às características microbiológicas para fenótipo de resistência antimicrobiana a antibióticos de primeira linha.
- Avaliar prevalência de *Staphylococcus* spp. quanto às características microbiológicas para tipagem molecular quanto à presença de genes de resistência *mecA* e tipos clonais por PFGE.
- Caracterizar os casos de infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. quanto aos aspectos clínicos para resposta terapêutica e óbito.
- Avaliar correlação entre aspectos epidemiológicos para idade, sexo, comorbidades, uso de cateteres vasculares e características microbiológicas para tipagem molecular quanto à presença de gene de resistência *mecA* e tipos clonais por PFGE.
- Avaliar associação entre aspectos clínicos, microbiológicos para tipagem molecular quanto à presença de genes de resistência *mecA* e tipos clonais por PFGE com resposta terapêutica ou óbito.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo observacional analítico do tipo corte transversal.

6.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Isolados clínicos bacterianos de *Staphylococcus* spp. identificados em bacteremias de pacientes em qualquer faixa etária e ambos os sexos, processados na rotina do laboratório de microbiologia clínica do Hospital das Clínicas / UFPE no período de Janeiro de 2016 a Fevereiro de 2017.

6.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados de prontuários disponíveis no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital das Clínicas/UFPE), localizado na cidade de Recife/PE no período de Janeiro de 2016 a Fevereiro de 2017. O hospital universitário presta atendimentos à saúde em nível terciário e dispõe de 418 leitos, dos quais 10 leitos são de Unidade de Tratamento Intensivo adulto/UTI cirúrgica e 20 leitos de UTI neonatal/Unidade de Cuidados Intensivos. A média de internamentos mensal é de 748 admissões e são realizadas cerca de 547 cirurgias (EBSERH, 2020). A definição diagnóstica dos casos de infecção de corrente sanguínea baseou-se nos critérios recomendados pela ANVISA (ANVISA, 2020).

6.4 DEFINIÇÃO DE TERMOS

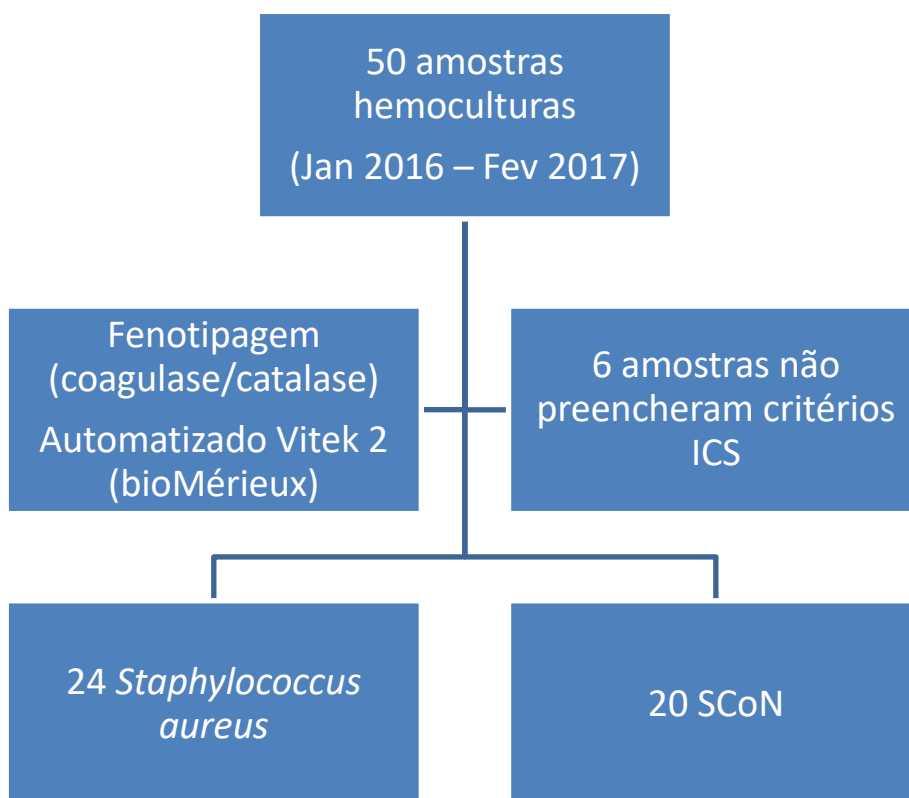
Definiu-se como infecção de corrente sanguínea a presença de microrganismo viável na corrente sanguínea identificada através de uma ou mais hemoculturas, não estando relacionada a outro foco infeccioso.

6.5 ISOLADOS BACTERIANOS

Em amostra por conveniência foram analisadas 50 hemoculturas coletadas em pacientes de

qualquer faixa etária assistidos em hospital terciário de Pernambuco no período de janeiro de 2016 a fevereiro de 2017 com isolados de *Staphylococcus* spp., conforme Figura 4. Os dados microbiológicos foram obtidos através de banco de dados extraídos de projeto de dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde (Andrade, 2018). Do total de amostras, 6 não preencheram critérios para infecção de corrente sanguínea tornando elegíveis para a pesquisa 24 isolados pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* e 20 isolados de *Sataphylococcus* coagulase negativa. Para a identificação da espécie bacteriana e suscetibilidade antimicrobiana foram realizadas provas bioquímicas fenotípicas (catalase, coagulase) e análise por metodologia automatizada Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital das Clínicas de Pernambuco. (Andrade, 2018).

Figura 4 – Identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. em amostras de hemoculturas de pacientes internados em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.



Fonte: A autora (2021).

Os isolados foram reprocessados no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) para confirmação da espécie por espectrometria de massa MALDI-TOF e pelo sistema MALDI Biotyper system versão 2.0 (Bruker Daltonics) (Angeletti, 2019).

Foi realizado teste de suscetibilidade antimicrobiana com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para agentes antimicrobianos de primeira linha para tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. (oxacilina, cefoxitina, vancomicina) e avaliada por microdiluição em caldo. Os isolados foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes a cada droga testada, de acordo com os critérios estabelecidos pelo documento M100-S28 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018) e BrCAST.

Feito pesquisa de cassete cromossomal relacionada a resistência a metilina e presença do gene *mecA* codificadores de resistência a beta lactâmicos por técnica de PCR multiplex. A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizados após revelação com SYBR Safe DNA Gel Stain (Sigma–Aldrich, USA).

A avaliação da relação genética entre os isolados foi feita pelo padrão de restrição genômico em eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE) utilizando-se enzima de restrição *SmaI*.

6.6 CATEGORIZAÇÃO DE VARIÁVEIS

6.6.1 Variáveis independentes

6.6.1.1 Aspectos clínicos epidemiológicos

Variável	Definição Conceitual	Definição Operacional	Categorização
Sexo	Distinção anatômica e biológica referentes a elementos do corpo como genitálias e aparelho reprodutivo. Variável qualitativa nominal dicotômica.	Registro em ficha cadastral de prontuário referido pelo paciente.	1- Feminino 2- Masculino
Idade	Período de tempo entre a data do nascimento e a data	Idade quantificada em anos completos.	Mediana

	da coleta da hemocultura. ^[1] Variável quantitativa contínua		
Comorbi- dades	Presença de duas ou mais doenças no mesmo paciente que podem influenciar o status imunológico, resposta terapêutica e o desfecho clínico das infecções: 1. Diabetes mellitus 2. Insuficiência renal crônica 3. Hipertensão arterial sistêmica 4. Pessoas vivendo com HIV (PVHIV) 5. Neoplasia Variável qualitativa nominal.	Presença de outra doença registrada pelo médico assistente no prontuário ou referida pelo paciente	Sim Não
Dispositi- vos invasivos	Dispositivos utilizados na assistência à saúde, caracterizados por romper barreiras naturais do organismo, penetrando em cavidades ou em tecidos estéreis (ZACARKIM, V.M.; SCUSSIATO, 2016): 1. Cateter venoso central: cateter utilizado para infusão, coleta de amostra sanguínea ou monitoramento hemodinâmico, cuja	Registro de presença de dispositivo invasivo.	Sim Não

	terminação está posicionada próxima ao coração ou em um grande vaso. São considerados grandes vasos: aorta, artéria pulmonar, veias cavas, veias braquicefálicas, veias jugulares internas, veias subclávias, veias ilíacas externa e comum, veias femorais e, em neonatos, cateter umbilical venoso ou arterial. (ANVISA 2017)		
--	--	--	--

6.6.1.2 Aspectos microbiológicos

Variável	Definição Conceitual	Definição Operacional	Categorização
Perfil de suscetibilidade	Perfil fenotípico dos isolados bacterianos de sensibilidade aos antimicrobianos. Variável qualitativa nominal.	Determinação da suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos de acordo com as recomendações do CLSI, a partir de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA): 1. Multissensível: isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados 2. OXA S: isolados sensíveis a oxacilina 3. OXA R: isolados resistentes a oxacilina	1. Multissensível 2. OXA S 3. OXA R 4. VANCO S 5. VANCO R

		4. VANCO S: isolados sensíveis a vancomicina 5. VANCO R: isolados resistentes a vancomicina	
Relação clonal entre os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	Clones são conjuntos de isolados que possuem o mesmo genoma. ^{[1][SEP]} Variável qualitativa nominal.	Avaliar a relação clonal entre os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. de acordo com PFGE e genótipo (PCR).	

6.6.2 Variáveis dependentes

Variável	Definição Conceitual	Definição Operacional	Categorização
Cura Clínica	Término do tempo de tratamento, associado à suspensão da prescrição de antimicrobianos pela melhora clínica do paciente. Variável qualitativa dicotômica.	Identificar em prontuário evolução médica com melhora clínica e laboratorial, além da suspensão de antibioticoterapia.	Sim Não
Óbito por infecção	Óbito resultante da infecção por <i>Staphylococcus</i> spp. Variável qualitativa dicotômica.	Verificar em prontuário se a bacteremia foi a causa do óbito.	Sim Não

6.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos foram processados nos softwares de análise estatística, SPSS Statistics, versão 25 para Windows (IBM Corporation, Amonk, NY, EUA) e GraphPad Prism 6

(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). As frequências absolutas e relativas das variáveis qualitativas, bem como os valores de mediana e intervalo interquartil da variável quantitativa “Idade”, foram determinados de acordo com a aplicabilidade. Devido ao n amostral limitado, foi aplicado o teste exato de Fisher como teste estatístico para verificação do nível de significância entre os grupos. Para a comparação clínica, epidemiológica e genotípica com o desfecho clínico das infecções, foram calculadas a razão de prevalência (RP) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de $p < 0,05$.

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do HC de acordo com resolução nº 466/12 CNS, sendo iniciada a coleta após anuência do comitê. Este trabalho está inserido em um projeto de pesquisa que abrange a vigilância microbiológica clínico e epidemiológica da resistência bacteriana no Hospital das Clínicas – CAAE 31641120.8.0000.8807.

8 RESULTADOS

8.1 ARTIGO – Caracterização molecular de *Staphylococcus* spp. e análise de associação clínica, epidemiológica e mortalidade em bacteremias em hospital terciário de Pernambuco

RESUMO

INTRODUÇÃO

Pesquisas em análise de associação entre características moleculares e desfecho clínico em bacteremias por *Staphylococcus* spp. têm demonstrado resultados conflitantes. Estudo de corte transversal foi conduzido para avaliar associação entre características clínicas, epidemiológicas, moleculares e mortalidade em bacteremias por espécies deste gênero.

METODOLOGIA

Foram analisadas 44 amostras de hemoculturas positivas de pacientes de qualquer faixa etária e sexo internados em hospital terciário de Pernambuco entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos por revisão de prontuário médico. A confirmação das espécies foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF e classificação molecular em grupos por eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE). Com a técnica de PCR *multiplex* identificaram-se os cassetes cromossomais para presença de genes *mecA*. A análise da associação entre as variáveis foi realizada através do cálculo da razão de prevalência aplicando o teste exato de Fisher para verificação do nível de significância e considerado p valor $\leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Entre os óbitos (n=19), houve prevalência no sexo feminino (n=13; 68%), acima de 45 anos (n=14; 74%), dentre os quais 78% usaram cateter venoso central. Houve associação entre os óbitos e o grupo molecular D (37%; p=0,03). Embora razão de prevalência de mortalidade de 2,5 (IC 95% 1,3-4,3; p= 0,01) em portadores de neoplasia, não foi encontrada associação

entre esta característica clínica e os diferentes grupos de isolados de *Staphylococcus* spp. identificados por técnica molecular de PFGE.

CONCLUSÃO

Embora não tenha sido encontrada associação entre grupos de similaridade molecular avaliadas por PFGE e características clínicas e epidemiológicas, a mortalidade em infecções por *Staphylococcus* spp. foi significativa entre pacientes portadores de neoplasias e cateter venoso central.

PALAVRAS- CHAVE

Staphylococcus sp., bacteremia, mortalidade, características clínicas, PFGE

INTRODUÇÃO

Infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter venoso central representa a segunda causa principal de infecções relacionadas a assistência à saúde no Brasil¹. Recente estudo com pesquisa de fatores relacionados ao hospedeiro como idade avançada, comorbidades e uso de dispositivos invasivos mostrou risco para pior desfecho clínico em infecções por *Staphylococcus* spp.^{2,3}. A análise molecular destes patógenos trouxe elucidações quanto à presença de fatores de virulência, produção de biofilmes ou mecanismos de escape aos efeitos do sistema imune e a identificação de complexos clonais e poderia contribuir na pesquisa de correlação entre as características moleculares dos clones prevalentes de uma região com aspectos clínicos, epidemiológicos e desfecho de infecção.

Estudo populacional prospectivo na Noruega encontrou associação entre linhagens clonais e mortalidade em infecções de corrente sanguínea por *S aureus*⁴. Entretanto, na Malásia não se verificou associação entre fatores clínicos, epidemiológicos, moleculares e mortalidade em bacteremias por *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA)⁵. Em relação à América Latina, um estudo envolvendo nove países analisou prevalência clonal de *S aureus* em pacientes com bacteremia identificando substituição do clone endêmico brasileiro (BEC) pela linhagem USA 100³.

Os resultados conflitantes quanto às análises de correlação entre características moleculares e desfecho clínico nestas infecções bem como os relatos voltados para prevalência clonal destas

cepas ainda são pouco elucidativos quanto aos fatores de risco nestas infecções. No Brasil, estudos de prevalência de cepas de *Staphylococcus* spp. quanto às características moleculares são mais frequentes como o descrito nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais^{6,7}.

O objetivo desta pesquisa foi analisar associação entre características moleculares, clínicas e epidemiológicas com desfecho clínico para infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. o que poderia trazer novas contribuições na terapia e medidas de prevenção de infecções por estas espécies.

METODOLOGIA

Estudo observacional analítico do tipo corte transversal avaliou a existência de associação entre as características clínicas, epidemiológicas e microbiológicas quanto ao fenótipo de resistência e tipagem molecular nas infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. em hospital terciário de Pernambuco entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

Foram analisadas 50 amostras de hemoculturas de pacientes internados de qualquer faixa etária e sexo com isolados de *Staphylococcus* spp. A definição diagnóstica dos casos de infecção de corrente sanguínea baseou-se nos critérios do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA)⁸.

As variáveis relacionadas ao desfecho clínico (óbito) e epidemiológicos (idade, sexo, comorbidades, uso de cateteres vasculares) foram coletadas de prontuários disponíveis no Serviço de Arquivo Médico (SAME).

Para a identificação da espécie bacteriana e suscetibilidade antimicrobiana foram realizadas provas bioquímicas fenotípicas (catalase, coagulase) e análise por metodologia automatizada *Vitek® 2* (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France).

Os isolados foram reprocessados pelo sistema *MALDI Biotyper system* versão 2.0 (Bruker Daltonics)⁹ para confirmação das espécies.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi obtida para agentes antimicrobianos recomendados para tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. (oxacilina, cefoxitina, vancomicina, daptomicina, linezolida) e avaliado por microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*¹⁰.

Os isolados foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes a cada droga testada, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*¹¹ e BrCAST.

Feito pesquisa de cassete cromossomal para presença dos genes *mecA* por técnica de PCR *multiplex*. A avaliação da relação genética entre os isolados foi feita pelo padrão de restrição genômico em eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE). Na análise pela técnica de PFGE o critério aplicado para distinção dos clones foi o estabelecido por Tenover segundo o qual os isolados com similaridade igual ou superior a 80% são considerados geneticamente relacionados¹².

Os dados obtidos foram processados nos softwares de análise estatística, SPSS *Statistics*, versão 25 para *Windows* (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) e *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). As frequências absolutas e relativas das variáveis qualitativas, bem como os valores de mediana e intervalo interquartil da variável quantitativa “Idade”, foram determinados de acordo com a aplicabilidade. Foi aplicado o teste exato de Fisher como teste estatístico para verificação do nível de significância entre os grupos. Para a comparação clínica, epidemiológica e genotípica com o desfecho clínico das infecções, foram calculadas a razão de prevalência (RP) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de $p < 0,05$.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa sob CAAE 31641120.8.0000.8807.

RESULTADOS

Entre as 50 amostras de hemoculturas analisadas, 44 preencheram critérios de infecção de corrente sanguínea¹³. Vinte e três amostras (52%) foram obtidas de pacientes do sexo feminino. A mediana calculada para a idade foi de 53 anos (P25-75% 33-70). Nefropatia (n=24; 54%), hipertensão (n=22; 50%) e neoplasia (n=12; 27%) foram as principais comorbidades encontradas no estudo conforme Tabela 1.

Os isolados da espécie *Staphylococcus aureus* representaram 54% (n=24) das amostras analisadas. Todas as espécies encontradas foram sensíveis à vancomicina entretanto, quando se analisou o perfil de suscetibilidade para oxacilina, apenas 3 isolados (15%) entre *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN) mostraram-se sensíveis comparados a 12 isolados (50%) de *S. aureus*.

Na pesquisa molecular observou-se prevalência da presença do cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*) IV (20%), seguido de SCC*mec* II 18%. Foram encontrados cinco grupos de similaridade (A-E) cada um com 8 a 12 bandas. Treze amostras (29%) representaram o grupo A e 11 (25%) grupo D. Em 82% dos isolados do grupo D foram identificados a presença do

gene *mecA*. A Figura 5 e a Figura 6 demonstram os padrões de bandas obtidas por PFGE dos isolados de *Staphylococcus aureus* e SCoN e a Fonte: A autora (2021).

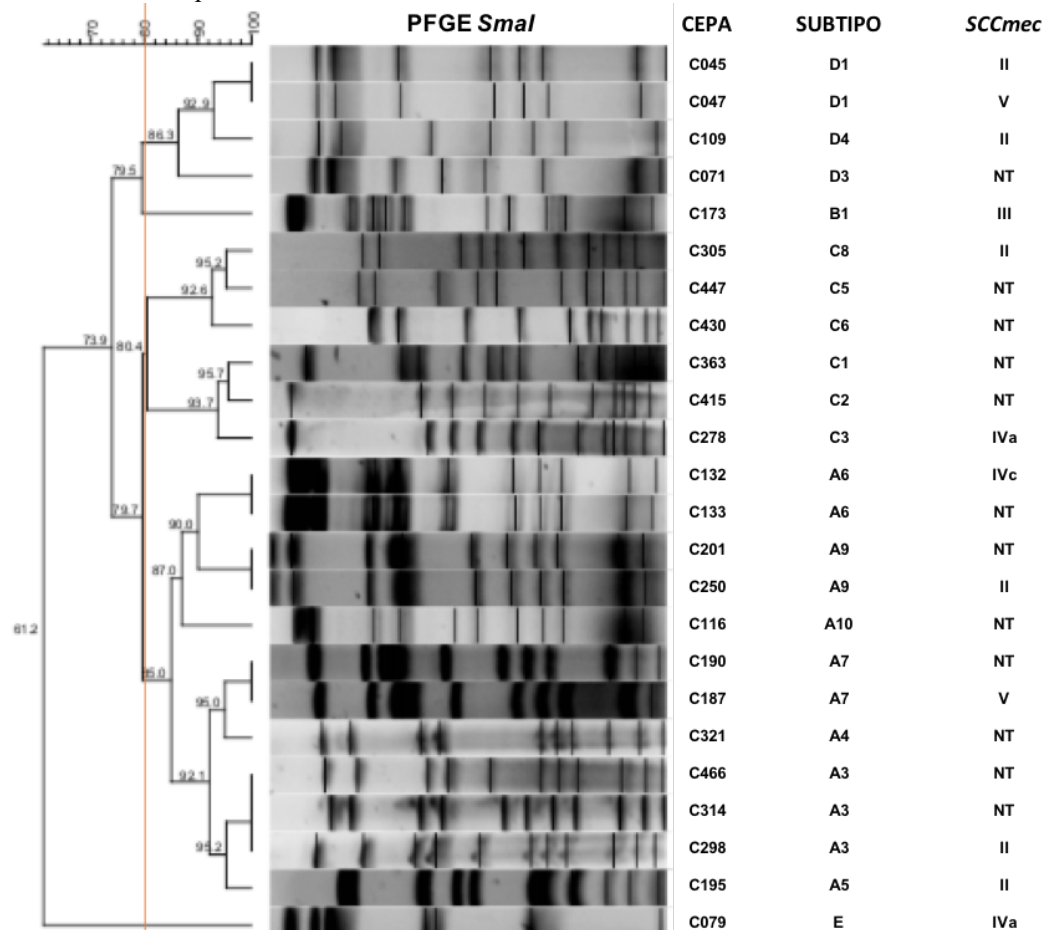
Tabela 2 mostra a frequência do gene *mecA* encontrado nos pulsotipos.

Tabela 1 – Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com infecções de corrente sanguínea em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.

Características	n=44	%
Epidemiológicas		
Idade (mediana, P ₂₅ -P ₇₅)	53	(33,2-69,5)
Sexo		
Feminino	23	(52,3)
Masculino		
Clínicas	21	(47,7)
DM	10	(22,7)
Nefropatia	24	(54,5)
HAS	22	(50,0)
Neoplasia	12	(27,3)
Tabagismo	13	(29,5)
HIV	5	(11,4)
LES	2	(4,5)
DPOC	3	(6,8)
Acesso venoso central	29	(65,9)
Antibioticoterapia	38	(86,4)
Bacteremia recorrente	12	(27,3)
Alta	24	(54,5)
Óbito em 30 dias	19	(43,2)
PITT score		
0	27	(61,4)
1	3	(6,8)
2	2	(4,5)
3	2	(4,5)
5	2	(4,5)
6	2	(4,5)
8	2	(4,5)
10	1	(2,3)
NT	3	(6,8)

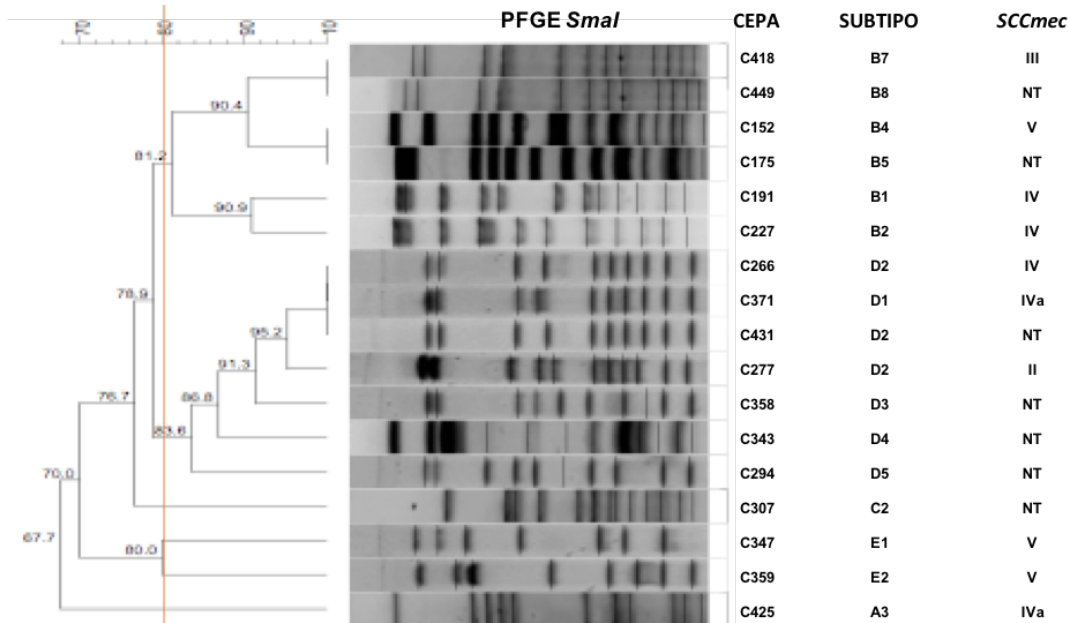
Fonte: A autora (2021).

Figura 5 – Dendograma com padrões de bandas obtidas por PFGE para isolados de *Staphylococcus aureus* em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.



Fonte: A autora (2021).

Figura 6 – Dendograma com padrões de bandas obtidas por PFGE para isolados de *Staphylococcus coagulase* negativa em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.



Fonte: A autora (2021).

Tabela 2 – Prevalência de *Staphylococcus* spp. quanto a presença de gene *mecA* por grupo de similaridade genética em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.

Grupo	PFGE sub	mecA			
		mecA		NT	
		n	%	n	%
A					
(n=13)	A3	3	(33,3)	1	(25,0)
	A4	0	(0,0)	1	(25,0)
	A5	1	(11,1)	0	(0,0)
	A6	1	(11,1)	1	(25,0)
	A7	2	(22,2)	0	(0,0)
	A9	1	(11,1)	1	(25,0)
	A10	1	(11,1)	0	(0,0)
B					
(n=8)	B1	2	(28,6)	0	(0,0)
	B2	1	(14,3)	0	(0,0)
	B4	1	(14,3)	0	(0,0)
	B5	1	(14,3)	0	(0,0)
	B7	1	(14,3)	0	(0,0)
	B8	1	(14,3)	1	(100,0)
C					
(n=7)	C1	0	(0,0)	1	(25,0)
	C2	1	(33,3)	1	(25,0)
	C3	1	(33,3)	0	(0,0)
	C5	0	(0,0)	1	(25,0)
	C6	0	(0,0)	1	(25,0)
	C8	1	(33,3)	0	(0,0)
D					
(n=11)	D1	3	(33,3)	0	(0,0)
	D2	3	(33,3)	0	(0,0)
	D3	0	(0,0)	2	(100,0)
	D4	2	(22,2)	0	(0,0)
	D5	1	(11,1)	0	(0,0)
E (n=3)	E	1	(100,0)	0	(0,0)
	E1	0	(0,0)	1	(50,0)
	E2	0	(0,0)	1	(50,0)
NT					
(n=2)	NT	2	(100,0)	0	(0,0)

Fonte: A autora (2021).

Entre os óbitos (n=19; 43%), o total de 14 pacientes (78%) fizeram uso de dispositivo invasivo (cateter venoso central) com razão de prevalência (RP) de 1,7 (IC 95% 0,68-4,19, p=0,3). A maioria dos óbitos ocorreu em pacientes com idade >45 anos (74%) com razão de prevalência de 1,98 comparando-se o sexo feminino e masculino (IC 95% 0,9-4; p = 0,07). Entre os sete pacientes com Pitt score ≥ 4 , seis evoluíram para óbito. Na Tabela 3 descreve-se a comparação clínica, epidemiológica e molecular com o desfecho clínico nas infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. na população estudada.

A razão de prevalência de mortalidade foi de 2,5 (IC 95% 1,3-4,3; p=0,01) em pacientes portadores de neoplasias. A mortalidade no grupo de isolados de espécies do grupo A foi de

10% (n=2) e no grupo D foi de 37% (n=7) com RP de 4,1 quando se compararam estes dois grupos (p=0,03). Na análise de associação das características clínico epidemiológicas e grupos de similaridade molecular encontrou-se p>0,05 quando aplicado o teste exato *Fischer* para estas variáveis, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 3 – Comparação clínica, epidemiológica, moleculares com o desfecho clínico das infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.

Características	Óbito em 30 dias				RP	IC 95%	p*
	Sim (n=19)		Não (n=25)				
	n	%	n	%			
Idade							
>45 anos	14	(73,7)	14	(56,0)	1,60	0,71-3,62	0,344
0-45 anos	5	(26,3)	11	(44,0)			
Sexo							
Feminino	13	(68,4)	10	(40,0)	1,98	0,92-4,25	0,076
Masculino	6	(31,6)	15	(60,0)			
Comorbidades							
DM	4	(23,5)	6	(24,0)	0,98	0,41-2,34	1,000
Nefropatia	9	(52,9)	15	(60,0)	0,84	0,41-1,75	0,755
HAS	11	(64,7)	11	(44,0)	1,67	0,76-3,67	0,222
Neoplasia	9	(50,0)	3	(12,5)	2,50	1,32-4,29	0,014
Tabagismo	8	(53,3)	5	(23,8)	2,02	0,95-4,29	0,090
HIV	3	(16,7)	2	(8,0)	1,52	0,67-3,44	0,634
LES	0	(0,0)	2	(8,0)	0,38	0,03-4,86	0,456
DPOC	2	(10,5)	1	(4,0)	1,61	0,67-3,87	0,570
Acesso venoso central	14	(77,8)	15	(60,0)	1,69	0,68-4,19	0,325
Antibioticoterapia	16	(88,9)	22	(91,7)	0,84	0,29-2,40	1,000
Bacteremia recorrente	9	(64,3)	3	(13,6)	3,60	1,55-8,38	0,003
Grupo							
D	7	(36,8)	4	(16,0)	-	-	-
A	2	(10,5)	11	(44,0)	4,14	1,07-15,97	0,039¹
B	5	(26,3)	3	(12,0)	1,02	0,51-2,05	0,959 ¹
C	4	(21,1)	3	(12,0)	1,11	0,51-2,43	0,787 ¹
E	0	(0,0)	3	(12,0)	5,00	0,36-69,34	0,230 ¹
SCCmec							
IV	2	(10,5)	1	(4,0)	-	-	-
II	3	(15,8)	5	(20,0)	1,78	0,54-5,90	0,347 ²
III	1	(5,3)	1	(4,0)	1,33	0,27-6,60	0,724 ²
IVa	2	(10,5)	3	(12,0)	1,67	0,44-6,36	0,455 ²
IVc	0	(0,0)	1	(4,0)	2,50	0,20-30,9	0,475 ²
V	0	(0,0)	5	(20,0)	7,50	0,47-118	0,152 ²

RP: Razão de prevalência. *Teste Exato de *Fisher* excluindo os não testados; ¹Teste Exato de *Fisher* utilizando o pulstipo D como risco (referência). ²Teste Exato de *Fisher* utilizando SCCmec IV como risco (referência).

Fonte: A autora (2021).

Tabela 4 – Comparação das características clínico epidemiológicas e tipagem molecular nas infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus* spp. em hospital terciário de Pernambuco entre Janeiro/2016 e Fevereiro/2017.

Características	Grupo								p* (AxB)	p* (AxC)	p* (AxD)	p* (AxE)		
	A (n=13)		B (n=8)		C (n=7)		D (n=11)						E (n=3)	
	n	%	n	%	n	%	n	%					n	%
Idade														
>45 anos	8	(61,5)	5	(62,5)	5	(71,4)	8	(72,7)	2	(66,7)	1,000	1,000	0,679	1,000
0-45 anos	5	(38,5)	3	(37,5)	2	(28,6)	3	(27,3)	1	(33,3)				
Sexo														
Feminino	7	(53,8)	4	(50,0)	4	(57,1)	7	(63,6)	1	(33,3)	1,000	1,000	0,697	1,000
Masculino	6	(46,2)	4	(50,0)	3	(42,9)	4	(36,4)	2	(66,7)				
DM	2	(15,4)	2	(25,0)	1	(14,3)	5	(45,5)	0	(0,0)	0,612	1,000	0,182	1,000
Nefropatia	9	(75,0)	4	(50,0)	3	(42,9)	7	(63,6)	1	(33,3)	0,646	0,356	1,000	0,518
HAS	6	(46,2)	2	(25,0)	5	(71,4)	8	(72,7)	1	(33,3)	0,399	0,374	0,239	1,000
Neoplasia	2	(15,4)	2	(25,0)	4	(57,1)	2	(18,2)	1	(33,3)	0,612	0,122	1,000	0,489
Tabagismo	4	(30,8)	2	(25,0)	3	(42,9)	2	(18,2)	1	(33,3)	1,000	0,651	0,649	1,000
HIV	2	(15,4)	1	(12,5)	1	(14,3)	0	(0,0)	0	(0,0)	1,000	1,000	0,482	1,000
LES	1	(7,7)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(33,3)	1,000	1,000	1,000	0,350
Acesso venoso central	9	(69,2)	3	(42,9)	5	(71,4)	9	(81,8)	2	(66,7)	0,203	1,000	0,649	1,000

Fonte: A autora (2021).

DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se taxa de distribuição equivalente de *Staphylococcus* spp. nas infecções de corrente sanguínea por estas espécies com resistência a oxacilina de pelo menos 50% entre os isolados. Dados de 2019 apontaram para perfil de suscetibilidade antimicrobiana semelhante nestes patógenos em pacientes com infecções de corrente sanguínea internados em UTIs no Brasil mas com prevalência de SCoN como agentes causadores¹⁴. Embora tenha havido redução anual de 17% na taxa de infecções hospitalares por MRSA entre 2005 e 2017 nos Estados Unidos, o CDC classifica estes patógenos como séria ameaça em seu relatório de resistência antimicrobiana com estimativa de 10.600 mortes em 2017¹⁵.

Fatores de risco para infecções estafilocócicas como uso de dispositivos invasivos, idade avançada, comorbidade e imunossupressão tem sido relatado na literatura^{5,16}. De forma semelhante, as principais comorbidades apresentadas pelos pacientes neste estudo foram nefropatia, hipertensão e neoplasias e mais da metade dos pacientes avaliados fizeram uso de cateter venoso central.

Os cassetes cromossômicos *mec* mais encontrados, II e IV, não apresentaram associação significativa com mortalidade ($p > 0,05$). O achado neste estudo da prevalência do SCC*mec* tipo IV é consistente com as descrições na literatura da emergência de isolados MRSA carreadores do SCC*mec* tipo IV em serviços de saúde anteriormente relacionados a infecções adquiridas na comunidade^{17,18}. Apesar do menor tamanho do SCC*mec* IV e carrear apenas o gene de resistência *mecA* quando comparado ao tipo II o qual possui estrutura genética mais complexa, Horváth *et al.* encontrou maior mortalidade por infecções causadas por isolados MRSA SCC*mec* tipo IV comparado aos isolados SCC*mec* tipo II¹⁹.

Na análise por PFGE entre os cinco grupos detectados, é provável que os isolados apresentem a mesma linhagem genética embora não tenham apresentado relação próxima conforme critério de similaridade descrita por Tenover¹³. Isto pode ser justificado pelo fato de os isolados terem sido coletados ao longo de um período maior que 6 meses.

Na comparação de características clínicas com mortalidade, houve associação com presença de doença neoplásica. Estudo anterior realizado por Bello-Chavolla *et al*²⁰ mostrou aumento na mortalidade em 30 dias por infecções de corrente sanguínea em pacientes portadores de neoplasias notadamente hematológicas. Análise multivariada em estudo retrospectivo realizado na Suíça também encontrou como preditores de mortalidade infecções de corrente sanguínea por estafilococos, doenças neoplásicas (hematológicas ou de órgãos sólidos) além de *score Pitt* para bacteremia²¹.

Houve associação entre mortalidade e grupo D de similaridade. Estudo de coorte prospectivo realizado na Coreia do Sul, analisou características moleculares genotípicas por técnicas de MLST e PFGE e presença de fatores de virulência em isolados de MRSA de pacientes com bacteremia. Foram observadas diferenças significativas entre resistência bacteriana e presença de genes de virulência nos principais complexos clonais. Entretanto não encontraram diferença estatisticamente significativa na mortalidade entre os grupos e não analisou a presença de *SCCmec*²². Uma vez que a maioria dos isolados deste grupo apresentaram o gene *mecA* a mortalidade poderia estar relacionada à resistência a meticilina em concordância aos achados em revisão sistemática publicada por Joo, Eun-Jeong *et al.* onde se observou aumento no risco de mortalidade associado a MRSA (OR 1,95; IC 95% 1.73-2.21; $p < 0,01$)²³.

Embora encontrado associação entre mortalidade e presença de neoplasia, não houve associação entre esta comorbidade e infecções causadas pelas espécies do grupo de similaridade molecular D (n=2; 18% $p=1,0$).

Estudos de associação entre características moleculares, clínicas e epidemiológicas em bacteremias por *Staphylococcus* spp. são escassas na literatura. Uma das limitações deste estudo está relacionada ao número amostral reduzido o qual poderia justificar os resultados encontrados no período e local estudados. Ainda assim, a mortalidade foi significativa entre pacientes portadores de neoplasias o que corrobora para a importância na prevenção de infecções por *Staphylococcus* spp. neste grupo. Da mesma forma, uma elevada prevalência de mortalidade em pacientes com cateter venoso central reforça a necessidade de adesão rigorosa aos protocolos de inserção e manutenção destes dispositivos.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve conflitos de interesse para este estudo.

FUNDING SOURCES

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM 2018jk. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2020.
2. Szubert A, Bailey SL, Cooke GS, Peto T, Llewelyn MJ, Edgeworth JD. Predictors of recurrence, early treatment failure and death from *Staphylococcus aureus* bacteraemia: Observational analyses within the ARREST trial. *Journal of Infection*. 2019 October;; 332-340.
3. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61.
4. Blomfeldt A, Eskesen AN, Aamot HV, Leegaard TM, Bjørn JV. Population-based epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: clonal complex 30 genotype is associated with mortality. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*. 2016 Feb;; 803-813.
5. Sit PS, Ju Teh CS, Idris , Ponnampalavanar . Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia: Correlations between clinical, phenotypic, genotypic characteristics and mortality in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *Elsevier*. 2018 Feb;; 132-141.
6. Chamon RC, Ribeiro SdS, da Costa TM, Nouér SA, Dos Santos KRN. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017; 21: 185-189.
7. Nascimento TC, Diniz CG, Silva VL, Machado ABF, Fajardo MO, De Oliveira TLR, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *The Brazilian Journal of Infectious Disease*. 2018; 22: 55-59.
8. Network NHS. Centers for Disease Control and Prevention. [Online].; 2021. Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf.
9. Angeletti S, Ciccozzi M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Dez; 76.

10. Institute CaLS. January 2015M07-A10Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. [Online].; 2015 [cited 2019 Dez 08. Available from: https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [Online].; 2018 [cited 2019 Dez 08. Available from: https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Producedby Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteriafor Bacterial Strain Typing. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1995.
13. Network NHS. Centers for Disease Control and Prevention. [Online].; 2021. Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf.
14. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online].; 2020. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes>.
15. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta.; 2019.
16. Lisowska-Łysiak K, Lauterbach , Międzobrodzki , Kosecka-Strojek. Epidemiology and Pathogenesis of Staphylococcus Bloodstream Infectionsin Humans: a Review. *Polish Journal of Microbiology*. 2021;; 13-23.
17. Niek , Teh CSJ, Idris , Sit PS, Lee YQ, Thong KL, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia, 2003–2015: Comparative evaluation of changing trends in molecular epidemiology and clinical outcomes of infections. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020.
18. Lee S, Garau , Kluytmans J, Malhotra-Kumar , Peschel , Harbarth , et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nature reviews Disease Primers*. 2018.
19. Horváth , Dobay , Sahin-Tóth , Juhász , Pongrácz , Iván , et al. Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study. *Annals of Clinical Microbiologyand Antimicrobials*. 2020.

20. Bello-Chavolla O, Bahena-Lopez , Garciadiego-Fosass PGF, Volkow , Garcia-Horton , Velazquez-Acosta , et al. Bloodstream infection caused by S.aureus in patients with cancer:a 10-year longitudinal single-center study. Supportive Care in Cancer. 2018 Junho.
21. Papadimitriou-Olivgeris M, Psychogiou R, Garessus J, Camaret A, Fourre N, Kanagaratnam S, et al. Predictors of mortality of bloodstream infections among internal medicinepatients in a Swiss Hospital: Role of quick Sequential Organ FailureAssessment. European Journal of Internal Medicine. 2019;; 86-92.
22. Kim , Choi , Kwon , Koo. Molecular epidemiology and virulence factors of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from patients with bacteremia. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2020.
23. Joo EJ, Park , Kang CI, Chung , Song JH, Lee , et al. Reevaluation of the impact of methicillin-resistance on outcomes in patients with Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis. Korean Journal of Internal Medicine. 2019;; 1347-1362.

9 CONCLUSÃO

- O presente estudo apresenta como limitações número amostral reduzido e ser unicêntrico, os quais poderiam justificar os resultados de associação entre as características clínicas, epidemiológicas e moleculares em bacteremias por *Staphylococcus* spp.
- Tratando-se de amostra por conveniência, cujos dados foram analisados através de revisão de prontuários médicos, sujeita-se a viés de mensuração uma vez que as informações contidas nos documentos podem apresentar erros de classificação ou dados incompletos.
- Entre os isolados de *Staphylococcus aureus* 50% destas espécies apresentaram resistência a oxacilina enquanto que 85% dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa foram resistentes a oxacilina.
- Os cassetes cromossomais estafilocócicos (SCCmec) IV e II foram prevalentes entre os isolados e os principais grupos de similaridade genética identificados por técnica de PFGE foram A e D.
- A mortalidade foi significativa entre pacientes portadores de neoplasia o que corrobora para a importância na prevenção de infecções por *Staphylococcus* spp. neste grupo.
- Houve alta prevalência de mortalidade em pacientes com cateter venoso central reforçando a necessidade de adesão rigorosa aos protocolos de inserção e manutenção destes dispositivos como estratégia na redução de bacteremias por patógenos de interesse no controle de resistência antimicrobiana como *Staphylococcus* spp.
- Entre os óbitos, a prevalência foi maior em pacientes com infecções de corrente sanguínea causadas por *Staphylococcus* spp. pertencentes ao grupo molecular de similaridade D.
- Não foi encontrada associação entre características clínico/epidemiológicas e moleculares.
- Reforça-se que o conhecimento do perfil fenotípico e molecular da microbiota dos serviços de saúde e sua região podem contribuir na definição de protocolos de tratamento adequados bem como contenção de surtos.

REFERÊNCIAS

- Şebnem Yılmaz, E. (Novembro de 2017). Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 1059-1064.
- AE, S. (2016). Determinants of outcome in hospitalized patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: results from National Surveillance in Canada, 2008–2012. *Infection Control*.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2017). Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.
- Al-Hasan, M. N. (2020). Resilience of the Pitt Bacteremia Score: 3 Decades and Counting. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 1834-1836.
- Andrade, C. A. (2018). PERFIL DE SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus* spp.
- Angeletti, S. (Dez de 2019). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infection, Genetics and Evolution*, 76.
- ANVISA. (26 de Outubro de 2020). Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 22. Acesso em 24 de Junho de 2021, disponível em Agência Nacional de Vigilância Sanitária: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes>
- ANVISA. (26 de Outubro de 2020). Caderno 2 - Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Acesso em Agosto de 2021, disponível em ANVISA: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/caderno-2-criterios-diagnosticos-de-infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude.pdf/@@download/file/Caderno%202%20-%20Crit%20C3%A9rios%20Diagn%20B3sticos%20de%20Infec>
- Argemi, X. (Mar de 2019). Coagulase-Negative *Staphylococci* Pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Arias, C. A. (2017). Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Latin-America: A Prospective Cohort Multicenter Study in Nine Countries . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- B.K., S.-K. (2015). The Genetic Manipulation of *Staphylococci*. *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1373). Nova Iorque: Humana Press, New York, NY.
- Barrett, F. F., McGehee, R. F., & Finland, M. (1968). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. *Bacteriologic and epidemiologic observations*. *New England Journal of Medicine*.

Bennett, J. E. (2015). Mandell, Douglas and Bennett's principals and practices of infectious disease. Filadélfia.

Blomfeldt, A. (Fev de 2016). Population-based epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: clonal complex 30 genotype is associated with mortality. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 803-813.

Brumfitt, W., & Hamilton-Miller, J. (1989). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine*, 1188-1196.

Buck, J. M., Como-Sabetti, K., Harriman, K. H., Danila, R. N., Boxrud, D. J., & Glennen, A. (2005). Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 1532-1538.

CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States. Antibiotic Resistance Threats in the United States . Atlanta.

CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States . Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, CD.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Acesso em 08 de Dez de 2019, disponível em https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf

Cookson, B. D. (Jun de 2007). Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: the HARMONY Collection. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 1830–1837.

David, M. Z. (Abr de 2019). The Importance of *Staphylococcus aureus* Genotypes in Outcomes and Complications of Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*.

Division of Healthcare Quality Promotion. (11 de Julho de 2021). 2019 National and State Healthcare-Associated Infections (HAI) Progress Report. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention: <https://arpsp.cdc.gov/profile/national-progress/united-states>

EBSERH. (2020). HC em Números. Acesso em 6 de Agosto de 2021, disponível em <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-nordeste/hc-ufpe/aceso-a-informacao/institucional>

European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Estocolmo.

Heilmann, C. (Nov de 2018). Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clinical Microbiology and Infection*, 25, 1071-1080.

Henderson, H. (2019). The Pitt Bacteremia Score Predicts Mortality in Nonbacteremic Infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 1826-1833.

Hiramatsu , K., Aritaka , N., Hanaki , H., Kawasaki , S., Hosoda , Y., Hori , S., . . . Kobayashi , I. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, 1670-1673.

Lakhundi S, Z. K. (Setembro de 2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*.

Lisowska-Lysiak, K. (12 de janeiro de 2021). Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans:a Review. *Polish Journal of Microbiology*, 70(1), 13-23.

Mirza, H. C. (2017). Glycopeptide Resistance in *S. aureus*. Em S. Enany , & L. E. Alexander, *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus* (pp. 43-59). Amasya: Shymaa Enany.

Network, N. H. (5 de Julho de 2021). Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection) . Fonte: Centers for Disease Control and Prevention: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf

Novosad, S. A. (2020). Pathogens causing central-line–associated bloodstream infections in acute-care hospitals—United States, 2011–2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 1-7.

Otto, M. (2010). Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, 143-162.

Park, S. Y. (2015). Coagulase-negative staphylococcal bacteremia: risk factors for mortality and impact of initial appropriate antimicrobial therapy on outcome. 34.

Recker, M. (Out de 2017). Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. *Nature Microbiology*, 2.

Rodrigo E. Mendes, H. S. (2018). Distribution of main Gram-positive pathogens causing bloodstream infections in United States and European hospitals during the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010–2016): concomitant analysis of oritavancin in vitro activity. *Journal of Chemotherapy*.

RR, K. (2010). Association of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) USA300 genotype with mortality in MRSA bacteremia. *The Journal of Infection*.

Santoro, A. (2020). Epidemiology and Risk Factors Associated With Mortality in Consecutive Patients With Bacterial Bloodstream Infection: Impact of MDR and XDR Bacteria. *Open Forum Infectious Diseases*.

Shariati, A., Dadashi, M., Moghadam, M. T., Belkum, A. v., Yaslianifard , S., & Darban-Sarokhalil , D. (2020). Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*.

Sit, P. S. (Fev de 2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia: Correlations between clinical, phenotypic, genotypic characteristics and mortality in a tertiary teaching hospital in Malaysia . Elsevier, 132-141.

Smith , A. C., & Hussey, M. A. (2005). Acesso em 6 de Agosto de 2021, disponível em American Society fo Microbiology: <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>

Souli M, R. (2019). Changing charac-teristics of *Staphylococcus aureus* bacteremia (SAB): results from a 21-year prospective longitudinal study. *Clinical Infectious Disease*.

Szubert, A. (Out de 2019). Predictors of recurrence, early treatment failure and death from *Staphylococcus aureus* bacteraemia: Observational analyses within the ARREST trial. *Journal of Infection*, 79(4), 332-340.

Tavares, W. (2014). Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. São Paulo: Atheneu.

Tenover, F. C. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Producedby Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteriafor Bacterial Strain Typing. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.

Tickler, I. A., Goering, R. V., Mediavilla, J. R., Kreiswirth, B. N., & Tenover, F. C. (2017). Continued expansion of USA300-like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among hospitalized patients in the United States. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 342-347.

Wang, S.-H. (16 de Apr de 2015). Molecular and Clinical Characteristics of Hospital and Community Onset Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, 1599-1608.

WHO. (dezembro de 2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. . Geneva.

Wi, Y. M. (abril de 2018). Clinical predictors of methicillin-resistance andtheir impact on mortality associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Epidemiology and Infection*, 146(10), 1326–1336. doi:10.1017/s0950268818001255 , 1326–1336.

Yushchuk , O., Binda , E., & Marinelli , F. (2020). Glycopeptide Antibiotic Resistance Genes: Distribution and Function in the Producer Actinomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 1173.

APÊNDICE A – ARTIGO

Molecular characterization of *Staphylococcus* spp. and analysis of clinical, epidemiological and mortality association in bacteremias at a tertiary hospital in Pernambuco

Cláudia Fernanda Azevedo Braga Albuquerque ¹, Carlos Alberto das Neves ², Danilo Elias Xavier ³, Cláudia Fernanda Lacerda Vidal ⁴, Vera Magalhães da Silveira ⁵

¹Hospital das Clínicas de Pernambuco, Health Care-Related Infection Control Service, Recife, PE, Brasil, ²Hospital das Clínicas de Pernambuco, Laboratório Microbiologia, Recife, PE, Brasil, ³Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE, Brasil, ⁴Hospital das Clínicas de Pernambuco, Infectious and Parasitic Diseases Service, Recife, PE, Brasil, ⁵Universidade Federal de Pernambuco, Tropical Medicine Department, Recife, PE, Brasil

Corresponding author:

Cláudia Fernanda Azevedo Braga Albuquerque
Recife, Pernambuco 52041350 – 81993228475
E-mail : cacaualbuquerque@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION

Research on analysis of the association between molecular characteristics and clinical outcome in bacteremias due to *Staphylococcus* spp. has shown conflicting results. A cross-sectional study was conducted to evaluate an association between clinical, epidemiological, molecular and mortality in bacteremias due to species of this genus.

MATERIALS AND METHODS

Forty-four positive blood culture samples from patients of any age and gender were analyzed at a tertiary hospital in Pernambuco between January 2016 and February 2017. Clinical and epidemiological data were obtained by medical records review. The species were confirmed using MALDI-TOF mass spectrometry and molecular classification in groups by Pulsed-

Field Gel Electrophoresis (PFGE). Multiplex PCR technique, searched for chromosomal cassettes and identified the presence of *mecA* gene. The analysis of the association between the variables was performed by calculating the prevalence ratio and applied Fisher's exact test to verify the significance level and considered $p \text{ value} \leq 0.05$ with a 95% confidence interval.

RESULTS

Among deaths ($n=19$), 78% of the patients used central line and female group represented 68% ($n=13$) of the total. The median age was 53 years. There was an association between deaths and molecular group D (37%; $p=0.03$). Although a mortality prevalence ratio of 2.5 (95% CI 1.3-4.3; $p=0.01$) in patients with cancer, no association was found between this clinical characteristic and the different groups of *Staphylococcus* spp. isolates identified by PFGE technique.

CONCLUSION

Although no association was found between groups of molecular similarity evaluated by PFGE technique and clinical and epidemiological characteristics, mortality due to *Staphylococcus* spp. bacteremia was significant among patients with cancer and central lines.

KEYWORDS

Staphylococcus sp., bacteremia, mortality, clinical characteristics, PFGE

INTRODUCTION

Central line related bloodstream infection represents the second leading cause of healthcare associated infections in Brazil ¹. A recent study with research of host-related factors such as advanced age, comorbidities and invasive devices use has shown higher risk for worse clinical outcome due to *Staphylococcus* spp. infections. The molecular analysis of these pathogens brought elucidations regarding the presence of virulence factors, biofilms production or immune system escape mechanisms and the identification of clonal complexes could contribute to the research of association between the molecular characteristics of the prevalent clones of a region with clinical, epidemiological and infection outcome aspects ^{2, 3}. Prospective study in Norway found an association between clonal strains and mortality in bloodstream infections due to *S. aureus*⁴. However, in Malaysia there was no association between clinical, epidemiological, molecular and mortality factors in bacteremias caused by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA)⁵. A study involving nine countries in

Latin America analyzed clonal prevalence of *S aureus* in patients with bacteremia identifying replacement of the Brazilian endemic clone (BEC) with the USA 100 lineage³.

Conflicting results regarding the association analyzes between molecular characteristics and clinical outcome in these infections as well as reports focused on clonal prevalence of these strains are still unclear as to the risk factors due to these infections. In Brazil, prevalence studies of molecular characteristics of *Staphylococcus* spp. strains are more frequent, such as that described in the states of Rio de Janeiro and Minas Gerais^{6, 7}.

The aim of this research was to analyze the association between molecular, clinical and epidemiological characteristics with clinical outcome in bloodstream infections caused by *Staphylococcus* spp. which could bring new contributions in therapy and measures to prevent infections due to these species.

METHODS

Analytical observational cross-sectional study evaluated the existence of association between clinical, epidemiological and microbiological characteristics regarding the phenotype of resistance and molecular typing in *Staphylococcus* spp. bloodstream infections at a tertiary hospital in Pernambuco between January 2016 and February 2017.

Fifty blood culture samples from hospitalized patients of any age group and sex with *Staphylococcus* spp. isolates were analyzed. Bloodstream infections definition was based on Centers for Disease Control and Prevention criteria (CDC/USA)⁸.

The variables related to clinical outcome (death) and epidemiological (age, sex, comorbidities, use of central line) were collected from medical records available at the Medical Archive Service (SAME).

Identification of bacterial species and antimicrobial susceptibility were performed using phenotypic biochemical tests (catalase, coagulase) and automated methodology analysis Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France). The isolates were reprocessed by maldi biotyper system version 2.0 (Bruker Daltonics) to confirm species⁹.

Minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained for antimicrobial agents recommended for the treatment of infections caused by *Staphylococcus* spp. (oxacillin, cefoxitin, vancomycin, daptomycin, linezolid) and evaluated by broth microdilution according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations¹⁰.

The isolates were classified as sensitive, intermediate or resistant to each drug tested, according to the criteria established by the Clinical and Laboratory Standards Institute¹¹ and BrCAST.

Multiplex PCR technique was performed to analyze chromosomal cassette presence and *mecA* gene. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analyzed the genetic relationship between the isolates according to genomic restriction patterns.

Data obtained were processed in the statistical analysis software, SPSS Statistics, version 25 for Windows (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The absolute and relative frequencies of qualitative variables, as well as the median and interquartile interval values of the quantitative variable "Age", were determined according to applicability. Fisher's exact test was applied as a statistical test to verify the significance level between the groups. For clinical, epidemiological and genotypic comparison with mortality, the prevalence ratio (PR) and the 95% confidence interval (95% CI) were calculated. Results with a p-value <0.05 were considered statistically significant.

The research was approved by the Research Ethics Committee under CAAE 31641120.8.0000.8807.

RESULTS

Among 50 blood culture samples analyzed, 44 met criteria for bloodstream infection¹². Twenty-three samples (52%) were obtained from female patients. The median calculated age was 53 years (P₂₅-75% 33-70). Nephropathy (n=24; 54%), hypertension (n=22; 50%) and cancer (n=12; 27%) were the main comorbidities found in the study according to Table 1.

Table 1 - Clinical and epidemiological characteristics of patients with bloodstream infections in a tertiary hospital in Pernambuco between January/2016 and February/2017.

Features	n=44	%
Age (median, P ₂₅ -P ₇₅)	53	(33,2-69,5)
Sex		
female	23	(52,3)
male	21	(47,7)
Diabetes	10	(22,7)
Nephropathy	24	(54,5)
Hypertension	22	(50,0)
Cancer	12	(27,3)
Smoking	13	(29,5)
HIV	5	(11,4)
Systemic Lupus	2	(4,5)
COPD	3	(6,8)
Central line	29	(65,9)
Antibiotics	38	(86,4)
Recurrent bacteremia	12	(27,3)
Discharge	24	(54,5)
Death in 30 days	19	(43,2)

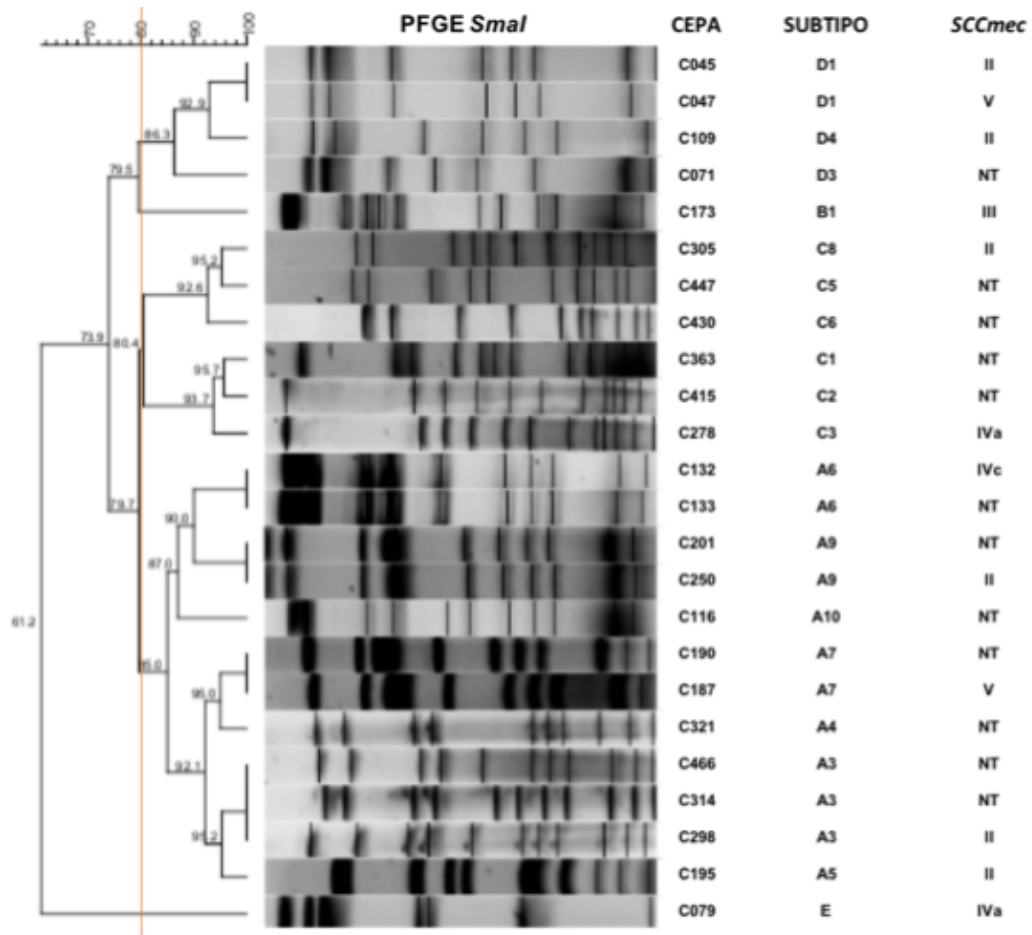
PITT score		
0	27	(61,4)
1	3	(6,8)
2	2	(4,5)
3	2	(4,5)
5	2	(4,5)
6	2	(4,5)
8	2	(4,5)
10	1	(2,3)
Nt	3	(6,8)

Source: The author (2021).

Staphylococcus aureus represented 54% (n=24) of the isolated species from the analyzed samples. All species were sensitive to vancomycin, however, when the sensitivity profile for oxacillin was analyzed, only 3 isolates (15%) of coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) showed sensitivity compared to 12 isolates (50%) of *S aureus*.

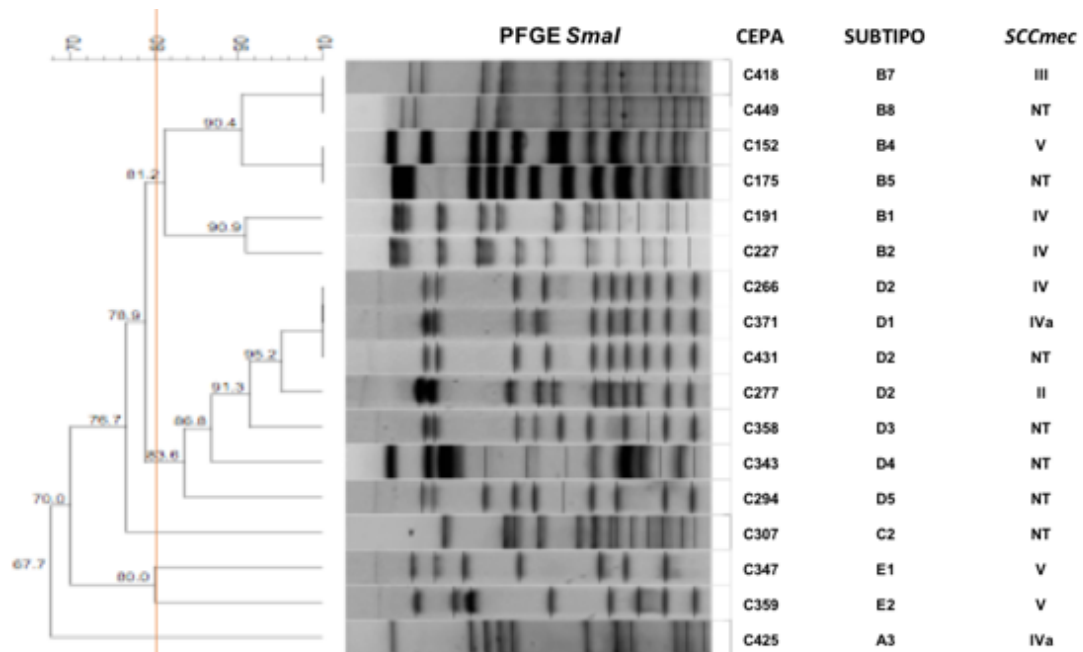
The molecular analysis showed the presence of chromosomal cassette SCCmec IV in 20% of the isolates followed by SCCmec II in 18%. The criteria applied to distinguish clones using PFGE technique was the established by Tenover according to which isolates with similarity equal to or greater than 80% are considered genetically related 13. Five similarity groups (A-E) were found each one with 8 to 12 bands. Thirteen samples (29%) represented group A and 11 (25%) group D. In 82% of group D isolates, the presence of the *mecA* gene was identified. Figures 1 and 2 show the band patterns obtained by PFGE of *Staphylococcus aureus* and CoNS isolates and Table 2 shows the frequency of *mecA* gene found in the pulse types.

Figure 1 – Dendogram with band patterns obtained by PFGE for *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary hospital in Pernambuco between January/2016 and February/2017.



Source: The author (2021).

Figure 2 – Dendrogram with band patterns obtained by PFGE for isolates of coagulase negative *Staphylococcus* in a tertiary hospital in Pernambuco between January/2016 and February/2017.



Source: The author (2021).

Among deaths (n=19; 43%), the total of 14 patients (78%) used an invasive device (central line) with a prevalence ratio (PR) of 1.7 (95% CI 0.68-4.19, p= 0.3). Most deaths occurred in patients aged >45 years (74%) with a prevalence ratio of 1.98 comparing females and males (95% CI 0.9-4; p = 0.07). Among seven patients with Pitt score ≥ 4 , six died. Table 3 describes the clinical, epidemiological and molecular comparison with the clinical outcome of bloodstream infections due to *Staphylococcus* spp. in the population studied.

The prevalence ratio of mortality was 2.5 (95% CI 1.3-4.3; p=0.01) in patients with cancer. Mortality in molecular similarity group A species was 10% (n=2) and in group D was 37% (n=7) with PR of 4.1 when these two groups were compared (p=0.03). Association analysis of epidemiological, clinical characteristics and molecular groups of similarity, a p>0.05 was found when Fischer's exact test was applied according to Table 4.

Table 2 - Prevalence of *Staphylococcus* spp. molecular typing in a tertiary hospital in Pernambuco between January/2016 and February/2017.

group	PFGE sub	<i>mecA</i>			
		<i>mecA</i>		Nt	
		N	%	N	%
A (n=13)	A3	3	(33,3)	1	(25,0)
	A4	0	(0,0)	1	(25,0)
	A5	1	(11,1)	0	(0,0)
	A6	1	(11,1)	1	(25,0)
	A7	2	(22,2)	0	(0,0)
	A9	1	(11,1)	1	(25,0)
	A10	1	(11,1)	0	(0,0)
B (n=8)	B1	2	(28,6)	0	(0,0)
	B2	1	(14,3)	0	(0,0)
	B4	1	(14,3)	0	(0,0)
	B5	1	(14,3)	0	(0,0)
	B7	1	(14,3)	0	(0,0)
	B8	1	(14,3)	1	(100,0)
C (n=7)	C1	0	(0,0)	1	(25,0)
	C2	1	(33,3)	1	(25,0)
	C3	1	(33,3)	0	(0,0)
	C5	0	(0,0)	1	(25,0)
	C6	0	(0,0)	1	(25,0)
	C8	1	(33,3)	0	(0,0)
D (n=11)	D1	3	(33,3)	0	(0,0)
	D2	3	(33,3)	0	(0,0)
	D3	0	(0,0)	2	(100,0)
	D4	2	(22,2)	0	(0,0)
	D5	1	(11,1)	0	(0,0)
E (n=3)	and	1	(100,0)	0	(0,0)
	E1	0	(0,0)	1	(50,0)

NT (n=2)	E2	0 (0,0)	1 (50,0)
	Nt	2 (100,0)	0 (0,0)

Source: The author (2021).

Table 3 - Clinical, epidemiological, molecular comparison with mortality in bloodstream infections due to *Staphylococcus* spp. in a tertiary hospital in Pernambuco between January/2016 and February/2017.

Characteristics	Death in 30 days				rp	IC 95%	p*
	Yes (n=19)		No (n=25)				
	N	%	N	%			
age							
>45 years old	14	(73,7)	14	(56,0)	1,60	0,71-3,62	0,344
0-45 years	5	(26,3)	11	(44,0)			
sex							
female	13	(68,4)	10	(40,0)	1,98	0,92-4,25	0,076
male	6	(31,6)	15	(60,0)			
Comorbidities							
Diabetes	4	(23,5)	6	(24,0)	0,98	0,41-2,34	1,000
Nephropathy	9	(52,9)	15	(60,0)	0,84	0,41-1,75	0,755
Hypertension	11	(64,7)	11	(44,0)	1,67	0,76-3,67	0,222
Cancer	9	(50,0)	3	(12,5)	2,50	1,32-4,29	0,014
Smoking	8	(53,3)	5	(23,8)	2,02	0,95-4,29	0,090
HIV	3	(16,7)	2	(8,0)	1,52	0,67-3,44	0,634
Systemic Lupus	0	(0,0)	2	(8,0)	0,38	0,03-4,86	0,456
COPD	2	(10,5)	1	(4,0)	1,61	0,67-3,87	0,570
Central line	14	(77,8)	15	(60,0)	1,69	0,68-4,19	0,325
Antibiotics	16	(88,9)	22	(91,7)	0,84	0,29-2,40	1,000
Recurrent bacteremia	9	(64,3)	3	(13,6)	3,60	1,55-8,38	0,003
Molecular group							
D	7	(36,8)	4	(16,0)	-	-	-
A	2	(10,5)	11	(44,0)	4,14	1,07-15,97	0.039¹
B	5	(26,3)	3	(12,0)	1,02	0,51-2,05	0.959 ¹
C	4	(21,1)	3	(12,0)	1,11	0,51-2,43	0.787 ¹
E	0	(0,0)	3	(12,0)	5,00	0,36-69,34	0.230 ¹
SCCmec							
IV	2	(10,5)	1	(4,0)	-	-	-
II	3	(15,8)	5	(20,0)	1,78	0,54-5,90	0.347 ²
III	1	(5,3)	1	(4,0)	1,33	0,27-6,60	0.724 ²
IVa	2	(10,5)	3	(12,0)	1,67	0,44-6,36	0.455 ²
IVc	0	(0,0)	1	(4,0)	2,50	0,20-30,9	0.475 ²
V	0	(0,0)	5	(20,0)	7,50	0,47-118	0.152 ²

PR: Prevalence ratio. *Fisher's Exact test excluding untested ones; ¹Fisher's exact test using the group D as a risk (reference). ²Fisher's exact test using SCCmec IV as a risk (reference).

Source: The author (2021).

Table 4 – Comparison of epidemiological, clinical characteristics and molecular typing in bloodstream infections due to *Staphylococcus* spp. in a tertiary hospital in Pernambuco between January/2016 and February/2017.

Features	group								p* (AxB)	p* (AxC)	p* (AxD)	p* (AxE)		
	A (n=13)		B (n=8)		C (n=7)		D (n=11)						E (n=3)	
	N	%	N	%	N	%	N	%					N	%
age														
>45 years old	8	(61,5)	5	(62,5)	5	(71,4)	8	(72,7)	2	(66,7)	1,000	1,000	0,679	1,000
0-45 years	5	(38,5)	3	(37,5)	2	(28,6)	3	(27,3)	1	(33,3)				
sex														
female	7	(53,8)	4	(50,0)	4	(57,1)	7	(63,6)	1	(33,3)	1,000	1,000	0,697	1,000
male	6	(46,2)	4	(50,0)	3	(42,9)	4	(36,4)	2	(66,7)				
Dm	2	(15,4)	2	(25,0)	1	(14,3)	5	(45,5)	0	(0,0)	0,612	1,000	0,182	1,000
nephropathy	9	(75,0)	4	(50,0)	3	(42,9)	7	(63,6)	1	(33,3)	0,646	0,356	1,000	0,518
HAS	6	(46,2)	2	(25,0)	5	(71,4)	8	(72,7)	1	(33,3)	0,399	0,374	0,239	1,000
Neoplasm	2	(15,4)	2	(25,0)	4	(57,1)	2	(18,2)	1	(33,3)	0,612	0,122	1,000	0,489
smoking	4	(30,8)	2	(25,0)	3	(42,9)	2	(18,2)	1	(33,3)	1,000	0,651	0,649	1,000
HIV	2	(15,4)	1	(12,5)	1	(14,3)	0	(0,0)	0	(0,0)	1,000	1,000	0,482	1,000
Les	1	(7,7)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(33,3)	1,000	1,000	1,000	0,350
Central venous access	9	(69,2)	3	(42,9)	5	(71,4)	9	(81,8)	2	(66,7)	0,203	1,000	0,649	1,000

Source: The author (2021).

DISCUSSION

The present study observed an equivalent distribution of *Staphylococcus* spp. in bloodstream infections with oxacillin resistance of at least 50% among the isolates. Data from 2019 pointed to a similar antimicrobial sensitivity profile in Brazilian ICUs causing bloodstream infections but with prevalence of CoNS as causative agents. Although there was an annual 17% reduction in the rate of hospital MRSA infections between 2005 and 2017 in the United States, the CDC classifies these pathogens as a serious threat in its antimicrobial resistance report with an estimated 10,600 deaths in 2017^{14, 15}.

Risk factors for staphylococcal infections such as use of invasive devices, advanced age, comorbidity and immunosuppression have been reported in the literature. Similarly, the main comorbidities presented by the patients in this study were nephropathy, hypertension and cancer and it is worth pointing out that more than half of the patients evaluated used a central line^{5, 16}.

The most commonly found *mec* chromosome cassettes, II and IV, did not present a significant association with mortality ($p > 0.05$). The finding in this study of the prevalence of SCC*mec* type IV is consistent with the descriptions in the literature of the emergence of MRSA isolates carriers of SCC*mec* type IV in healthcare services previously related to community-acquired infections^{17, 18}. Despite the smaller size of SCC*mec* IV only carrying the resistance gene *mecA*, when compared to type II which has more complex genetic structure, Horváth *et al.* found higher mortality from infections caused by MRSA SCC*mec* type IV isolates compared to SCC*mec* type II isolates¹⁹.

In the PFGE analysis among the five groups detected, it is likely that the isolates present the same genetic lineage although they did not present a close relationship according to the similarity criteria described by Tenover. This can be justified by the fact that the isolates were collected over a period longer than 6 months¹³.

In the comparison of clinical characteristics with mortality, there was an association with the presence of neoplastic disease. Bello-Chavolla *et al.* showed an increase in 30-day mortality caused by bloodstream infections in patients with hematological malignancies. Multivariate analysis in a retrospective study conducted in Switzerland also found as predictors of mortality staphylococcal bloodstream infections, neoplastic diseases (hematological or solid organs) and Pitt score for bacteremia^{20, 21}.

There was an association between mortality and group D of molecular similarity. A prospective cohort study conducted in South Korea analyzed genotypic molecular characteristics by MLST and PFGE techniques and the presence of virulence factors in MRSA isolates of patients with bacteremia. Significant differences were observed between bacterial resistance and the presence of virulence genes in the main clonal complexes. However, no statistically significant difference in mortality between groups was found and the presence of *SCCmec* was not analyzed²². Since most of the isolates in this group presented the *mecA* gene, mortality could be related to methicillin resistance in accordance with the findings in a systematic review published by Joo, Eun-Jeong et al. where there was an increase in the risk of mortality associated with MRSA (OR 1.95; 95% CI 1.73-2.21; $p < 0.01$)²³.

Although an association was found between mortality and the presence of cancer, we found no association between this clinical and molecular characteristic for group D of molecular similarity ($n=2$; 18% $p=1.0$).

Studies of association between molecular, clinical and epidemiological characteristics in bacteremias by *Staphylococcus* spp. are scarce in the literature. One of the limitations of this study is related to the reduced sample number, which could justify the results found in the period and place studied. Nevertheless, mortality was significant among patients with neoplasms, which corroborates the importance of prevention of *Staphylococcus* spp. infections in this group. Similarly, a high prevalence of mortality in patients with central line reinforces the need for strict access to the protocols for insertion and maintenance of these devices.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors state that there were no conflicts of interest for this study.

FUNDING SOURCES

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

1. ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM 2018jk. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2020.
2. Szubert A, Bailey SL, Cooke GS, Peto T, Llewelyn MJ, Edgeworth JD. Predictors of recurrence, early treatment failure and death from *Staphylococcus aureus* bacteraemia: Observational analyses within the ARREST trial. *Journal of Infection*. 2019 October;; 332-340.
3. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61.
4. Blomfeldt A, Eskesen AN, Aamot HV, Leegaard TM, Bjørn JV. Population-based epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: clonal complex 30 genotype is associated with mortality. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*. 2016 Feb;; 803-813.
5. Sit PS, Ju Teh CS, Idris , Ponnampalavanar . Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia: Correlations between clinical, phenotypic, genotypic characteristics and mortality in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *Elsevier*. 2018 Feb;; 132-141.
6. Chamon RC, Ribeiro SdS, da Costa TM, Nouér SA, Dos Santos KRN. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017; 21: 185-189.
7. Nascimento TC, Diniz CG, Silva VL, Machado ABF, Fajardo MO, De Oliveira TLR, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil, over a six-year period. *The Brazilian Journal of Infectious Disease*. 2018; 22: 55-59.
8. Network NHS. Centers for Disease Control and Prevention. [Online].; 2021. Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf.

9. Angeletti S, Ciccozzi M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Dez; 76.
10. Institute CaLS. January 2015M07-A10Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. [Online].; 2015 [cited 2019 Dez 08. Available from: https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [Online].; 2018 [cited 2019 Dez 08. Available from: https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf.
12. Network NHS. Centers for Disease Control and Prevention. [Online].; 2021. Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Producedby Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteriafor Bacterial Strain Typing. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1995.
14. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online].; 2020. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes>.
15. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta.; 2019.
16. Lisowska-Łysiak K, Lauterbach , Międzobrodzki , Kosecka-Strojek. Epidemiology and Pathogenesis of Staphylococcus Bloodstream Infectionsin Humans: a Review. *Polish Journal of Microbiology*. 2021;; 13-23.
17. Niek , Teh CSJ, Idris , Sit PS, Lee YQ, Thong KL, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia, 2003–2015: Comparative evaluation of changing trends in molecular epidemiology and clinical outcomes of infections. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020.
18. Lee S, Garau , Kluytmans J, Malhotra-Kumar , Peschel , Harbarth , et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nature reviews Disease Primers*. 2018.

19. Horváth , Dobay , Sahin-Tóth , Juhász , Pongrácz , Iván , et al. Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2020.
20. Bello-Chavolla O, Bahena-Lopez , Garcíadiego-Fosass PGF, Volkow , García-Horton , Velázquez-Acosta , et al. Bloodstream infection caused by *S.aureus* in patients with cancer: a 10-year longitudinal single-center study. *Supportive Care in Cancer*. 2018 Junho.
21. Papadimitriou-Olivgeris M, Psychogiou R, Garessus J, Camaret A, Fourre N, Kanagaratnam S, et al. Predictors of mortality of bloodstream infections among internal medicine patients in a Swiss Hospital: Role of quick Sequential Organ Failure Assessment. *European Journal of Internal Medicine*. 2019;; 86-92.
22. Kim , Choi , Kwon , Koo. Molecular epidemiology and virulence factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with bacteremia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020.
23. Joo EJ, Park , Kang CI, Chung , Song JH, Lee , et al. Reevaluation of the impact of methicillin-resistance on outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2019;; 1347-1362.