



ANÁLISE DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE
Staphylococcus aureus
NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA

GUSTAVO BALDUINO LEITE

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ILDINETE SILVA PEREIRA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. CYNTHIA MARIA KYAW

BRASÍLIA/DF: OUTUBRO/2008

GUSTAVO BALDUINO LEITE

ANÁLISE DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE
Staphylococcus aureus
NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira
Co-orientadora: Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw

BRASÍLIA/DF: OUTUBRO/2008

LEITE, Gustavo Balduino

Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília. Brasília, 2008.

101 f.

Orientadora: Ildinete Silva Pereira

Co-Orientadora: Cynthia Maria Kyaw

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular.

1. Infecção Hospitalar. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. MRSA. 4. Brasil .
I. Leite, Gustavo Balduino. II. Universidade de Brasília. III. Título

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Profa. Cynthia Maria Kyaw e à Profa. Ildinete Silva Pereira. É impossível expressar aqui a minha gratidão pela oportunidade de trabalhar com vocês, pela amizade demonstrada inúmeras vezes, pela paciência ... e principalmente pela confiança. Mesmo que todos os experimentos tivessem dado errado, a simples convivência com vocês teria valido a pena.

Agradeço a minha mãe e meus irmãos por todo carinho e apoio, e ao meu pai que, do outro lado, estava sempre me dando forças.

Agradeço a minha noiva pelo carinho, compreensão, paciência, companheirismo e pelas várias horas me ajudando na bancada, etiquetando centenas de tubos de PCR, guardando ponteira, revisando meus textos...

Aos meus colegas (e amigos) de mestrado, Márcio e Marina. Vocês ajudaram tanto, na bancada e com opiniões que é impossível enumerar aqui.

Aos colegas de laboratório: alunos, estagiários, professores e técnicos, por toda ajuda, orientação, desorientação e bom humor. Porque afinal, um bom ambiente de trabalho é fundamental.

“...o saber não está na ciência alheia, que se absorve, mas, principalmente, nas idéias próprias, que se geram dos conhecimentos absorvidos, mediante a transmutação, por que passam, no espírito que os assimila. Um sabedor não é armário de sabedoria armazenada, mas transformador reflexivo de aquisições digeridas...”

Rui Barbosa, 1920.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno associado a altas taxas de mortalidade e morbidade, capaz de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano. Sua capacidade em adquirir resistência à antibióticos e de sobreviver em diferentes condições ambientais o torna um perigoso agente infeccioso no ambiente hospitalar. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento da ocorrência de indivíduos portadores assintomáticos de *S. aureus* suscetíveis (MSSA) ou resistente a metilicina (MRSA) no âmbito do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e na comunidade e, o desenvolvimento de procedimentos moleculares para identificação de MSSA e de MRSA. No total foram coletadas 327 amostras nasais e sub-ungueais de profissionais e alunos vinculados ao HUB. Essas amostras foram divididas em três grupos: Alunos (medicina, enfermagem e odontologia), Equipe Médica (enfermeiros, auxiliares e técnicos de enfermagem e médicos) e Técnicos (funcionários que não possuem contato com pacientes). Também foram coletadas 48 amostras de pacientes previamente identificadas como MRSA pelo HUB e 136 amostras de indivíduos sem contato com o ambiente hospitalar (comunidade). Todas as amostras foram submetidas a crescimento em meios de cultura seletivos e diferenciais e testadas quanto a produção de coagulase para a identificação de *S. aureus*. Os isolados foram então submetidos ao teste de susceptibilidade à oxacilina e vancomicina. Os isolados de comunidade e de pacientes foram submetidos a ensaios de PCR para confirmação dos resultados bioquímicos através de iniciadores específicos para os genes que codificam proteína A, coagulase e nuclease termoestável, específicos de *S. aureus*, e *mecA*, presente em MRSA. A porcentagem de portadores de *S. aureus* encontrada na comunidade foi de 17,64%, e nos grupos relacionados ao ambiente hospitalar de 56,02%, sendo que: Alunos 69,64%; Equipe Médica 47,54% e Técnicos 51,02%. A diferença de portadores de cada grupo e o grupo comunidade foi significativa ($P \leq 0,001$), o que indica que indivíduos sem contato com o ambiente hospitalar possui menos tendência de estar colonizado por *S. aureus*. Em relação a MRSA, a porcentagem de portadores na comunidade foi de 1,47%, e entre os indivíduos relacionados ao ambiente hospitalar 37,95%. Nos alunos a frequência foi de 53,57%, equipe médica 22,95% e técnicos 38,77%. Dentro do grupo técnicos destaca-se os funcionários da lavanderia, onde 52,2% foram caracterizados como portadores de MRSA. A diferença dos grupos associados ao hospital e o grupo comunidade foi

significativa ($P \leq 0,001$). Apenas dois isolados de pacientes não confirmaram a caracterização prévia, sendo considerados *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à oxacilina. Todos os isolados de comunidade e pacientes identificadas como *Staphylococcus aureus* e como MRSA nos testes bioquímicos também foram positivos nos ensaios de PCR. Os três isolados de pacientes caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à oxacilina foram positivos apenas na amplificação do gene *mecA*, confirmando os resultados nos testes bioquímicos. Nenhuma amostra apresentou resistência à vancomicina. Nossos resultados sugerem uma alta frequência de portadores de MRSA no ambiente hospitalar, contrariamente ao observado na comunidade. O número de portadores de MRSA entre alunos e funcionários da lavanderia levanta a questão do possível papel que estes indivíduos podem estar desempenhando na disseminação dessas cepas resistentes pelo hospital, no entanto essa pergunta só poderá ser respondida através de estudos específicos. Os ensaios moleculares demonstraram o potencial dessa metodologia no diagnóstico rápido de infecções por MRSA, o que possibilita não só um tratamento mais eficiente como uma redução na disseminação dessas cepas.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, Nosocomial, *Staphylococcus aureus*, MRSA.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a pathogen associated with high rates of mortality and morbidity, capable of producing infections in various tissues of the human body. His ability to acquire resistance to antibiotics makes it a dangerous infectious agent in the hospital environment. The purpose of this work was to survey the incidence of asymptomatic carriers of *S. aureus* resistant (MRSA) and susceptible (MSSA) to methicillin in the University Hospital of Brasília (HUB), and the development of procedures for molecular identification of MSSA and MSRA strains. In total 327 samples were collected nasal and sub-nail of individuals related to the HUB. These samples were divided into three groups: students (medicine, nursing and dentistry), medical staff (nurses, nursing assistants and doctors) and the Technical Group (employees who do not have contact with patients). Were also collected 48 samples from patients previously identified as MRSA by HUB and 136 samples from individuals without contact with the hospital environment (community). All samples were inoculated into the culture medium and Baird Parker, and colonies with phenotypic characteristics of *S. aureus* were tested for fermentation of mannitol and coagulation of rabbit's plasma to confirm the identification. Samples confirmed as *S. aureus* were then subjected to the test of susceptibility to oxacillin and vancomycin. Samples from community and patients were also subjected to PCR confirmation of the biochemical results through DNA fragment amplification using specific primers for genes that encodes protein A, coagulase and the thermal-stable nuclease, all specific to *S. aureus*, and *mecA*, which is present in MRSA. The rate of *S. aureus* carriers found in the community was 17.64%, and the total of groups related to the hospital was 56.02%, of which: Students 69.64%; Technicians 51.02% and Medical Staff 47.54%. The difference in carriers of each group and in the community group was significant ($P \leq 0001$), which indicates that individuals without contact with the hospital have fewer chances to be colonized by *S. aureus*. For MRSA, the rate of carriers in the community was 1.47%, and among individuals related to the hospital was 37.95%, while in the Students group the rate was 53.57%, in the Medical Staff group was 22.95% and in the Technicians group was 38.77%. Inside the Technicians group, 52,2% of the workers in hospital's laundry were colonized with MRSA. The difference between the groups associated with the hospital and the community group was significant ($P \leq 0001$). Only two samples of patients did not confirm the prior

characterization made by HUB and was considered *Staphylococcus* coagulase negative oxacillin resistant. All samples of community and patients identified as *Staphylococcus aureus* and MRSA in biochemical tests were also positive in the PCR test. The three samples of patients characterized as *Staphylococcus* coagulase negative oxacillin resistant was positive only for the amplification of the *mecA* gene, confirming the results in biochemical tests. No sample proved resistant to vancomycin. Our results suggest a high rate of MRSA carriers among hospital workers and students. The number of MRSA carriers among students and worker of the laundry raise the question about the role of these individuals over the dissemination of MRSA through the hospital wards. Further studies focused on that matter would be necessary to answer this question. The molecular experiments showed the potential of this methodology on a fast diagnosis of MRSA infections, what would not just help the treatment, but should avoid the disseminations of those clones.

Key-words: Hospital Infections, Nosocomial, *Staphylococcus aureus*, MRSA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação da epidemia de cólera através da teoria de miasma	18
FIGURA 2. A chegada da Penicilina foi acompanhada por uma grande euforia, levando a produção e uso descontrolado desse antibiótico	19
FIGURA 3. Esquema do processo de sinalização para produção de β -lactamase, uma enzima que inativa a penicilina	25
FIGURA 4. Complexo do gene <i>mec</i>	25
FIGURA 5. Estrutura e classificação dos tipos de SCC <i>mec</i>	26
FIGURA 6. (A) Ação da vancomicina sobre a formação da parede celular de peptidoglicano e (B) mecanismo de resistência mediado pelo gene <i>vanA</i>	28
FIGURA 7. Colônias características do gênero <i>Staphylococcus</i> em meio de cultura Baird Parker	48
FIGURA 8. Preparação do ágar Manitol-sal em tubo inclinado e comparação entre uma amostra positiva (amarelo), uma negativa (rosa) e um tubo não inoculado	49
FIGURA 9. Perfil eletroforético em gel de agarose corado com brometo de etídio de DNA total extraído de amostras de <i>S. aureus</i>	75
FIGURA 10. Perfil eletroforético em gel de agarose corado com brometo e etídio dos fragmentos amplificados na reação de PCR realizada com iniciadores específicos do gene <i>mecA</i> realizado com DNA provenientes de 3 extrações distintas	76
FIGURA 11. Perfil eletroforético em gel de agarose corado com brometo de etídio dos fragmentos amplificados por PCR empregando-se os iniciadores específicos para os genes de nuclease, proteína A e coagulase	76
FIGURA 12. Perfil eletroforético, em gel de agarose corado com brometo de etídio, dos produtos de amplificação resultantes de ensaios de PCR empregando-se os iniciadores específicos para os genes de coagulase e <i>mecA</i>	77

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Aumento do número de publicações científicas sobre infecção hospitalar, de 1900 a 2008	20
GRÁFICO 2. Gráfico 2: Número de indivíduos de cada grupo amostrado. Grupos de estudo: Alunos, Técnicos e Equipe Médica. Grupos controle: Comunidade (negativo) e Pacientes (positivo)	46
GRÁFICO 3. Frequência de portadores de <i>S. aureus</i> após a caracterização bioquímica.	52
GRÁFICO 4. À esquerda frequência de portadores de <i>Staphylococcus aureus</i> nos grupos relacionados com o ambiente hospitalar (Alunos, Técnicos e Equipe Médica), e à direita taxa de portadores de <i>S. aureus</i> na comunidade	53
GRÁFICO 5. : Perfil de susceptibilidade à oxacilina das amostras identificadas como <i>S. aureus</i> . Grupos: Alunos, Técnicos, Equipe Médica, Comunidade e Pacientes	54
GRÁFICO 6. Perfil de susceptibilidade à oxacilina das amostras identificadas como <i>S. aureus</i> de cada grupo estudado	54
GRÁFICO 7: Frequência de indivíduos portadores de MRSA. Valores referentes aos grupos Alunos, Equipe Médica, Técnicos e comunidade.....	55
GRÁFICO 8: Frequência de indivíduos portadores de MRSA dos grupos com contato hospitalar: Alunos, Equipe Médica e Técnicos.....	56
GRÁFICO 9: Frequência de indivíduos portadores de MRSA no grupo Comunidade.....	57
GRÁFICO 10: Representação por proporção de cada grupo estudado. Cada barra representa 100% das amostras do respectivo grupo. Os valores impressos nas barras representam os valores absolutos do número de indivíduos não portadores, portadores de <i>S. aureus</i> sem resistência à oxacilina (MSSA) e portadores de <i>S. aureus</i> resistentes à oxacilina (MRSA)	58
GRÁFICO 11: Representação da proporção do tipo de colonização por MRSA nos grupos de estudo. Cada barra representa 100% das amostras do respectivo grupo. Os valores impressos nas barras representam os números absolutos de indivíduos colonizados apenas no nariz (vermelho), em ambos os locais (Azul) e apenas nas unhas (verde)	60
GRÁFICO 12: Número de amostras coletadas por categoria de cada grupo de estudo	64
GRÁFICO 13: Caracterização das amostras de alunos divididos por curso de formação.....	65

GRÁFICO 14. Número de portadores de MRSA que tiveram a caracterização nas amostras nasais e sub-ungueais	66
GRÁFICO 15. Classificação do grupo Técnicos, por setor de atividade	68
GRÁFICO 16. Tipo de contaminação do grupo Técnicos subdividido por setor de trabalho. Dados referentes a portadores de MRSA	69
GRÁFICO 17. Proporção de portadores entre os profissionais do Grupo Equipe Médica	71
GRÁFICO 18. Tipo de contaminação do grupo Equipe médica subdividida por profissional	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Mecanismos de resistência a algumas classes de antibióticos utilizados por <i>S. aureus</i>	24
TABELA 2. Tipos de <i>SCCmec</i> e padrões de resistência à antibióticos	27
TABELA 3. Lista dos iniciadores utilizados, seqüências nucleotídicas e tamanho do fragmento esperado para cada par	43
TABELA 4. Lista dos iniciadores inespecíficos utilizados, suas respectivas seqüências nucleotídicas e referência bibliográfica	44
TABELA 5: Número de amostras coletadas divididas por grupos	46
TABELA 6: Isolados identificados presuntivamente como <i>S. aureus</i> , após as duas primeiras etapas de identificação em meios de cultura seletivos e diferenciais	50
TABELA 7: Resultado do teste de coagulação de plasma de coelho, das amostras previamente caracterizadas como <i>S. aureus</i> , em Ágar Manitol-Sal	51
TABELA 8: Número de amostras identificadas como <i>S. aureus</i> e número de indivíduos portadores de <i>S. aureus</i>	52
TABELA 9. Números e proporções dos resultados encontrados por Grupo de Estudo e no grupo Comunidade	57
TABELA 10. Proporção do tipo de colonização por MRSA nos grupos de estudo.....	60
TABELA 11. Números e proporções dos resultados encontrados por curso no grupo Alunos ...	65
TABELA 12. Resultado final do grupo Técnicos	67
TABELA 13. Resultado do grupo Equipe Médica. Um total 61 de indivíduos participaram da pesquisa, sendo 14 (23%) portadores de MRSA	70
TABELA 14. Resultados dos testes estatísticos realizados com o grupo controle Comunidade .	73

LISTA DE ABREVIATURAS

BEC - Brazilian epidemic clone

BP - Baird Paker (Meio de cultura para identificação de *Staphylococcus aureus*)

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

EMRSA - European Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

HIV - Human Immunodeficiency Vírus

HUB - Hospital Universitário de Brasília

LB – Meio de cultura Luria Bertani

MIC - Minimum inhibitory concentration

MRSA - Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA - Methicillin susceptible *Staphylococcus*

NAM - Ácido N-acetilmurâmico

NAG - N-acetilglucosamina

NCCLS - National Commmittee for Clinical Laboratory Standards

ORSA - Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus*

PBP - Penicilin Binding Protein

PCR – Polimerase Chain Reaction

PFGE - Pulsed field gel electrophoresis

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

SCCmec - Staphylococcal Cassete Cromossomal mec

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

UnB - Universidade de Brasília

VRE - Vancomycin Resistant Enterococci

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 Introdução	17
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.2.1 Histórico	21
1.2.2 Virulência de <i>S. aureus</i>	22
1.2.3 Resistência a antimicrobianos	23
1.2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) e a Infecção Hospitalar	28
1.2.5 Infecção Hospitalar no Brasil	31
1.2.6 MRSA nos Hospitais Universitários Brasileiros	32
2. OBJETIVOS	33
3. METODOLOGIA	34
3.1 Local e período do estudo	34
3.2 Caracterização dos grupos amostrados	34
3.2.1. Alunos	34
3.2.2. Comunidade	34
3.2.3. Equipe médica	34
3.2.4. Pacientes	35
3.2.5. Técnicos	35
3.3. Critérios de exclusão	35
3.4. Consentimento livre e esclarecido	35
3.5. Apreciação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília	36
3.6. Meios de cultura	36
3.7. Soluções, tampões e enzimas	38
3.8. Procedimentos experimentais	40
3.8.1. Coleta das amostras	40
3.8.2. Isolamento	40
3.8.3. Caracterização bioquímica	41

3.8.4. Caracterização do perfil de sensibilidade à oxacilina e à vancomicina	41
3.8.5. Manutenção das linhagens bacterianas	42
3.8.6 Extração e purificação de DNA total	42
3.8.7 Ensaio de PCR	43
3.8.8 Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose	45
3.9. Análises estatísticas	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Amostragem	46
4.2 Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> por meio de testes microbiológicos e bioquímicos convencionais, das amostras coletadas	47
4.2.1 Primeiro inóculo: Ágar Baird Parker	48
4.2.2 Crescimento em ágar manitol-sal	48
4.2.3 Coagulação de plasma de coelho	50
4.2.4 Análise do padrão de suscetibilidade à oxacilina e vancomicina	53
4.3. Frequência de indivíduos portadores de <i>Staphylococcus aureus</i> susceptíveis (MSSA) e resistentes à oxacilina (MRSA), em relação à população total analisada	55
4.4 Discussão e Relevância dos Resultados Obtidos na População Hospitalar	58
4.5 Análise do perfil dos portadores dos Grupos de Estudo	64
4.5.1. Alunos	64
4.5.2. Técnicos	67
4.5.3 Equipe médica	70
4.5.5 Comunidade	72
4.6 Caracterização molecular de <i>S. aureus</i> a partir das amostras coletadas	73
4.6.1 Extração de DNA	74
4.6.2 Reações de PCR para a detecção de genes específicos de <i>S. aureus</i> e do gene <i>mecA</i> , que confere resistência à oxacilina	75
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	79
6. BIBLIOGRAFIA	80

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	92
APÊNDICE A – FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA-HOSPITALAR	94
APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA-COMUNIDADE	96
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98
APÊNDICE D – TABELA DE RESUMO COM OS RESULTADOS OBTIDOS.....	100

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Introdução

A infecção hospitalar, se definida como toda infecção adquirida ou transmitida no espaço hospitalar, surgiu no período medieval, época em que foram criadas instituições para alojar pessoas doentes, peregrinos, pobres e inválidos. A reunião indiscriminada de pessoas em um ambiente confinado facilitava a transmissão de doenças contagiosas e, o desconhecimento sobre os mecanismos de disseminação, ocasionava a contaminação da água, alimentos, instrumentos e o ambiente, caracterizando e reproduzindo as epidemias que assolavam a Idade Média [1]. A precariedade dos recursos humanos e da infra-estrutura somado ao desconhecimento da existência dos microrganismos, impossibilitava a idéia do controle da transmissão de doenças, que eram simplesmente atribuídas a algo divino e sobrenatural [1, 2].

A partir do século XVIII, com a transformação do hospital de um local onde se aguardava a morte para um local onde eram realizados o tratamento e eventualmente a cura, a disseminação de doenças passou a ser um aspecto considerado como relevante. Essa transformação foi impulsionada pelo capitalismo industrial, que levou o homem a valorizar o corpo como um objeto potencial de trabalho [1].

As primeiras evidências de disseminação de doenças em ambientes hospitalares foram registradas na primeira metade do século XIX, quando Oliver Holmes verificou que a febre puerperal passou de condição rara, assumindo um caráter epidêmico. A partir de uma análise de registros estatísticos, Holmes sugeriu que a doença poderia ser transmitida pelas mãos e aventais sujos dos médicos ao atenderem as parturientes [3]. Seguindo a mesma hipótese, em 1847 na Áustria, o obstetra Ignaz Philipp Semmelweis realizou uma investigação comparando a taxa de mortalidade de parturientes internadas em duas enfermarias de uma maternidade: em uma, o atendimento era realizado por parteiras e na outra, por estudantes de medicina. Ao constatar que a taxa de mortalidade entre as parturientes atendidas por estudantes de medicina era superior àquela das mulheres atendidas por parteiras, Semmelweis associou tal fato ao hábito de lavagem das mãos com água clorada, comportamento realizado pelas parteiras e negligenciado pelos estudantes. Após esta pesquisa, foi instituída a lavagem obrigatória das mãos com água clorada antes do atendimento ao parto. Essa simples medida ocasionou uma redução na mortalidade de 12% para 3% entre a parturientes [2].

A partir das crescentes evidências sobre os mecanismos de transmissão das doenças, a

origem divina destas foi substituída pela “teoria do miasma”. Essa teoria descrevia o responsável pela disseminação como um vapor venenoso, repleto de partículas provenientes de matéria em decomposição (Figura 1). Esse vapor poderia ser formado a partir de pessoas doentes ou até mesmo a partir da sujeira acumulada pela falta de higiene [4]. Em 1854, motivada pela “teoria do miasma”, a enfermeira Florence Nightingale reorganizou um hospital de campanha na Guerra de Criméia. Além de instituir uma rotina de higienização nas enfermarias, determinou uma distância mínima entre os leitos e separou os pacientes de acordo com as enfermidades. Dessa forma, Nightingale esperava reduzir o vapor venenoso e diminuir a transmissão das doenças. Tal iniciativa reduziu a taxa de mortalidade dos internados de 42% para valores inferiores à 2% [4].



Figura 1: Representação da epidemia de cólera através da teoria de miasma.
Fonte: “http://en.wikipedia.org/wiki/Miasma_theory_of_disease”

Durante o estabelecimento da Teoria dos Germes, Robert Koch, que atuava como conselheiro no Departamento Imperial de Saúde (Alemanha), emitiu uma norma exigindo a esterilização de todos os equipamentos utilizados em procedimentos cirúrgicos, e uma rotina de higienização em todo o hospital [5]. Essas ações, na segunda metade do século XIX, marcaram o início das medidas de controle da infecção hospitalar [6].

No início do século XX, a Teoria dos Germes já era amplamente aceita. A identificação de agentes antimicrobianos de possível uso terapêutico como a penicilina, publicada em 1928 por Alexander Fleming, e sua produção e comercialização pelo laboratório Merck em 1942 vieram seguidos de grande euforia (Figura 2). Acreditava-se que em pouco tempo existiriam medicamentos para combater a maioria das infecções [7]. Porém, pouco mais de 1 ano após a comercialização da penicilina, foi isolada em um hospital uma cepa de *Staphylococcus* resistente a esse antibiótico [8]. No início da década de 50, 40% dos isolados de *S. aureus* em

hospitais correspondiam a linhagens resistentes [9]. Esse foi o início da guerra travada entre o desenvolvimento cada vez mais rápido e eficiente de medicamentos bactericidas contra o surgimento da resistência bacteriana.

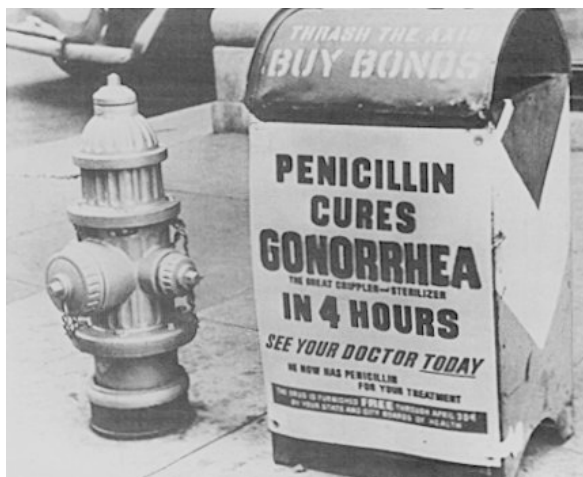


Figura 2. A chegada da Penicilina foi acompanhada por uma grande euforia, levando a produção e uso descontrolado desse antibiótico.

Fonte: “<http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillin>”

Por sua concepção, hospitais são ambientes de considerável risco biológico. Suas enfermarias abrigam diversas pessoas com variados tipos de doenças infecciosas, cujos agentes etiológicos podem ser facilmente disseminados. As bactérias possuem uma poderosa habilidade de fluxo gênico, ou seja, conseguem receber e transmitir determinados genes para outras bactérias, sejam estas da mesma espécie ou não. O confinamento de indivíduos com diferentes tipos de infecções em um único local propicia esse fluxo gênico que, associado à pressão seletiva causada pela administração inadvertida de antibióticos, acelera o processo de seleção natural e disseminação dos genes de resistência [2].

Em 1969 foi proposta nos EUA a criação do Registro Nacional de Bacteremias, que revelou a triste realidade de 250 mil infecções, com um total de 50 mil óbitos anuais. A proporção dessas infecções foi estimada em 10 casos para 1000 admissões hospitalares [10]. Desde então, o número de pesquisas sobre infecções hospitalares teve uma rápida ascensão (Gráfico 1). Dois agentes patogênicos são frequentemente citados como responsáveis por infecção hospitalar: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* [7]

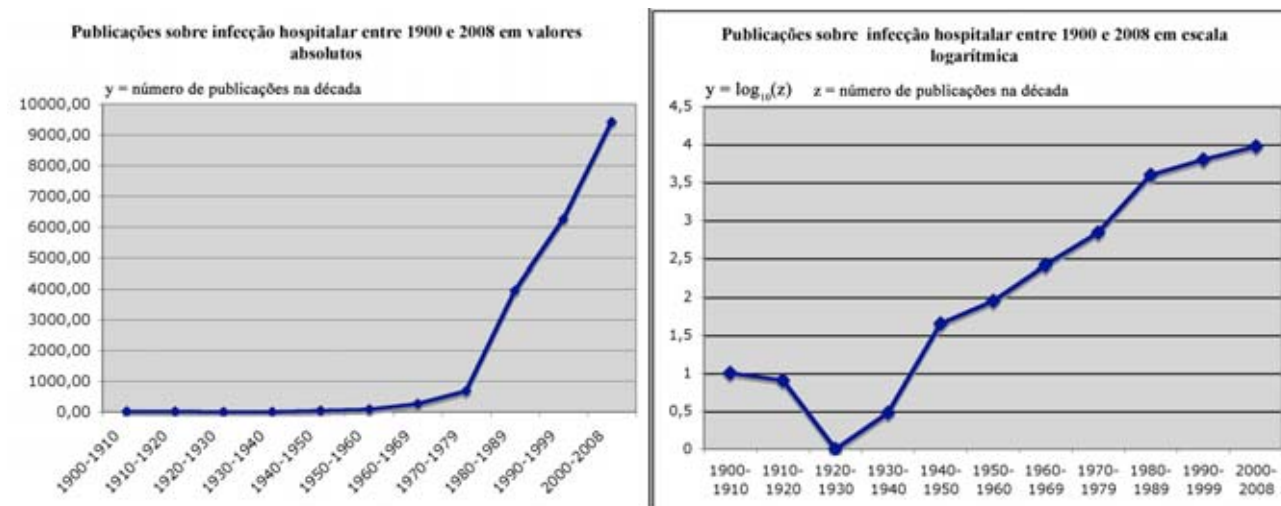


Gráfico 1: Aumento do número de publicações científicas sobre infecção hospitalar, de 1900 a 2008. À esquerda, gráfico dos números absolutos de publicações em cada década. À direita, uma representação logarítmica dos números absolutos de cada década. Observa-se um aumento exponencial no número de publicações a partir de meados da década de 60. Estes dados foram obtidos a partir de uma busca realizada na página da internet <http://www.scirus.com>, utilizando os termos “nosocomial infections” e “hospital infections”. O resultado foi filtrado de modo que fossem apresentados apenas artigos científicos de cada década selecionada. Esta página de busca de periódicos realiza pesquisa em diversos bancos de dados internacionais, como *Pubmed* e *Science Direct*.

A transmissão dessas bactérias nos hospitais se dá principalmente pelo ar e pelo contato direto [11], mas os funcionários de hospitais também são considerados potenciais portadores assintomáticos dessas bactérias, podendo colaborar para sua dispersão. Dentre os portadores permanentes, normalmente tais microrganismos estão presentes no nariz e na pele, sendo sua ocorrência mais comum em homens que em mulheres [12]. Esses portadores (funcionários de hospitais e equipe médica) não desenvolvem a doença porque, em condições normais, o sistema imunológico humano consegue combater tais invasores. Por outro lado, pacientes mais debilitados tais como portadores de câncer, pacientes em pós-operatório, portadores de HIV e outros casos que acarretam imunodeficiência, correspondem aos principais alvos dessas bactérias [9, 13].

No Japão, a partir de 1991 foram encontradas linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a todos os tipos de antibióticos conhecidos, levando ao óbito cerca de 20% dos indivíduos infectados por tais linhagens [7]. Pouco depois deste relato, pesquisas realizadas em vários países também revelaram não só a ocorrência desse tipo de resistência em *Staphylococcus aureus*, como também apontando-o como o maior responsável por infecções tanto hospitalares como na comunidade em geral [14].

É nítida a importância que vem sendo dada à questão da resistência destes organismos a

múltiplas drogas. Ano após ano, o número de artigos científicos e estudos epidemiológicos voltados a esse assunto vem aumentando em proporção geométrica. Tais tipos de infecções estão sendo consideradas epidemias de abrangência nacional em vários países como EUA, França, Coréia do Sul, África do Sul, Escócia, Dinamarca entre outros [15].

1.2 *Staphylococcus aureus*

1.2.1 Histórico

Antes da introdução dos antibióticos na década de 40, os isolados de *Staphylococcus* eram responsáveis pela maioria das infecções hospitalares, principalmente em pacientes com pneumonias [16]. No momento da comercialização da penicilina no início da década de 40, todas as infecções causadas por bactérias desse gênero eram susceptíveis a esse medicamento, porém em poucos anos foram isoladas cepas resistentes [17]. Para combater essas novas infecções, foram utilizados outros antibióticos lançados à época, como eritromicina, tetraciclina e aminoglicosídeos, o que resultou no surgimento de cepas multi-resistentes já na década de 50 [17].

Em 1960 foi lançado um novo antibiótico, uma penicilina sintética que possuía atividade microbicida inclusive contra as bactérias multi-resistentes, a meticilina [16]. A comunidade médica e científica ficou então convencida que tinha armas suficientes para combater qualquer tipo de infecção que pudesse surgir [7]. Tal consideração entretanto foi revista quando, somente um ano após o lançamento da meticilina, Jevons *et al.* (1961) descreveu o isolamento de uma cepa resistente ao novo antibiótico [18].

Entre os anos de 1957 e 1966, mais de 2000 cepas de *S. aureus* foram isoladas de hemoculturas na Dinamarca, o que resultou no primeiro estudo epidemiológico relacionado à resistência de *S. aureus* aos antibióticos, publicado em 1969 [9, 13]. Esse estudo revelou uma prevalência de *S. aureus* e resistência à penicilina no ambiente hospitalar de 85% [9].

As linhagens de *Staphylococcus aureus* apresentam como característica a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a agentes antimicrobianos. O uso extensivo de antibióticos resultou em um aumento na resistência de *S. aureus* em isolados clínicos. Em algumas áreas, mais de 95% das ocorrências de infecções por *S. aureus* são devido a cepas resistentes à penicilina ou ampicilina, e mais de 50% apresentam resistência a meticilina, uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por este organismo [19].

1.2.2 Virulência de *S. aureus*

A eficiência da disseminação de *S. aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade desse microorganismo. A capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, pressão osmótica ou deficiência de nutrientes, possibilita não só a colonização do homem como do ambiente ao seu redor, criando reservatórios de células aptas a colonizar outros indivíduos [20, 21]. De fato, *S. aureus* é uma bactéria comum na microbiota humana, colonizando de forma persistente as narinas de cerca de 20% da população e de forma intermitente 30%. A maioria dos portadores são assintomáticos e o processo de infecção normalmente está associado a algum fator que diminui a resposta imunológica do indivíduo, como doenças, tratamentos mais agressivos, ou procedimentos médicos invasivos, que abrem uma via de acesso para os microorganismos [22, 23].

A patogenicidade de *S. aureus* é um processo que envolve uma grande quantidade de componentes extra-celulares e da parede celular, que são coordenadamente expressos durante os diferentes estágios da infecção. Esses estágios podem ser definidos como: colonização, evasão das defesas do hospedeiro, divisão celular e disseminação bacteriana.

A colonização ocorre em geral pelo contato físico do hospedeiro com um reservatório de células [9]. Microorganismos do gênero *Staphylococcus* são bastante adaptados para sobreviver nas condições do ambiente externo, inclusive quando expostos à irradiação solar [24]. Em experimentos realizados, foi verificado que cepas de MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) são capazes de sobreviver por mais de 1 mês em roupas, tecidos e plásticos comumente utilizados em hospitais [25], e por mais de um ano nas embalagens descartáveis de materiais estéreis (gazes, luvas e etc.) [26]. A colonização de objetos como televisões, interruptores de luz, controles remotos e até mesmo parede, foi também relatada [21]. Dessa forma, a contaminação e posterior colonização pode ocorrer tanto após o contato com um indivíduo portador, como a partir de um objeto contaminado.

Após o contato ocorre a fixação da célula ao hospedeiro e neste estágio, *S. aureus* possui adesinas específicas para vários tipos de tecidos humanos [23]. A colonização do homem por *S. aureus* ocorre com certa facilidade, porém o início de um processo infeccioso normalmente depende de fatores externos. Um procedimento médico invasivo ou mesmo uma doença crônica pode criar as condições necessárias para o início das infecções oportunistas características de *S. aureus* [22, 23].

Uma vez estabelecida, a bactéria deve proteger-se contra o ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Uma série de genes são então coordenadamente expressos para evitar a fagocitose das células invasoras [14]. Os produtos de tais genes são responsáveis pela formação de cápsula, síntese da proteína A e de coagulase. [27].

Esses entre outros fatores transformam o *S. aureus* em um incrível agente patológico, podendo causar uma vasta gama de infecções associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade [28-29]. Sua versatilidade e alta capacidade de disseminação causou os relatos de clones epidêmicos em diferentes países, que se não passaram a adotar medidas específicas e onerosas contra a disseminação tiveram que conviver com taxas endêmicas dessas infecções [30-31].

1.2.3 Resistência a antimicrobianos

Os mecanismos de aquisição de resistência podem ser classificados em dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano, ou aquisição de um gene de resistência de outro microorganismo, através de transdução, transformação ou conjugação [17]. Essas modificações no genoma dos microorganismos normalmente estão relacionadas a [32]:

- Mudança na enzima ou estrutura alvo
- Mudança na via metabólica alvo
- Bombas de efluxo
- Inativação do antibiótico por:
 - Degradação do antibiótico
 - Inibição competitiva

Em *Staphylococcus aureus*, os mecanismos de resistência aos medicamentos mais comuns estão apresentados na Tabela 1

Tabela 1: Mecanismos de resistência a algumas classes de antibióticos utilizados por *S. aureus*. Extraído de Lowy *et al.* (2003) [7] com adaptações.

Classe de Antibiótico	Exemplo de drogas	Gene de resistência	Mecanismo	Origem da resistência
β-Lactâmicos	<i>Penicilina</i> <i>Ampicilina</i>	<i>blaZ</i>	Degradação da droga	Exógena
	<i>Oxacilina</i>	<i>mecA</i>	Alteração do alvo diminuindo a afinidade	Exógena
Glicopeptídicos	<i>Vancomicina</i>	<i>vanA</i>	Alteração do alvo da droga.	Exógena
		Desconhecido	Inibição competitiva	Desconhecido
Quinolonas	<i>Ciprofloxacin</i> <i>Levofloxacin</i> <i>Trovafoxacin</i>	<i>parC</i> <i>gyrA</i> ou <i>gyrB</i>	Alteração do alvo diminuindo a afinidade	Mutação
Aminoglicosídeos	Gentamicina	<i>aac(6')-Ie+aph(2')</i> <i>ant(4')-Ia</i> <i>aph(3')-IIIa</i> entre outros.	Degradação da droga	Exógena

As penicilinas pertencem a família dos antibióticos β-lactâmicos. Dois mecanismos de resistência foram descritos em *S. aureus*. O primeiro corresponde à inativação da droga pela clivagem do anel β-lactâmico. A enzima responsável, β-lactamase, é codificada pelo gene *blaZ*, presente em um plasmídeo [7]. A produção dessa enzima pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1*. O primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor. Quando não existe penicilina no meio, BlaI se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima BlaR1, presente na membrana celular, que por sua vez cliva a enzima BlaI, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de β-lactamase (Figura 3) [33].

A metecilina foi a primeira penicilina semi-sintética resistente a β-lactamase desenvolvida. Esta mantém o sítio de ligação à enzima PBP mas, devido a uma alteração estrutural, essa droga perdeu a afinidade pela β-lactamase, evitando assim sua clivagem por bactérias produtoras dessa enzima. A PBP é responsável pela ligação cruzada entre os polímeros de NAM (ácido N-acetilmurâmico) e NAG (N-acetilglucosamina) da parede de peptidoglicano e, a inativação dessa enzima, provoca o rompimento da parede celular resultando na lise da célula [7].

A resistência contra essa nova geração de penicilina foi detectada menos de um ano após seu lançamento, embora seu uso clínico seja extensivo ainda nos dias de hoje. Em *S. aureus*, a estratégia de resistência para essa nova penicilina mudou da inativação da droga, como acontecia através da produção de β-lactamase, para alteração da enzima alvo, a PBP.

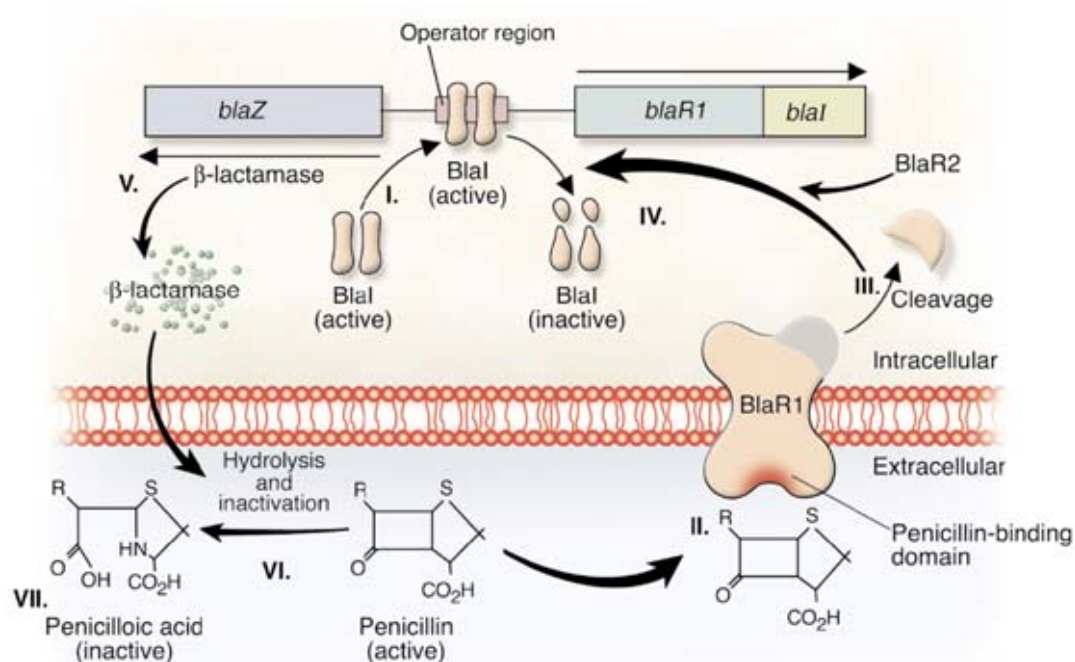


Figura 3. Esquema do processo de sinalização para produção de β-lactamase, uma enzima que inativa a penicilina.

Fonte: Lowy *et al.* (2003) [7], com adaptações.

Curiosamente, a via de sinalização para início de produção dessa enzima modificada, a PBP2a, é similar ao da produção de β-lactamase descrito na Figura 3. O gene *mecR1*, de função homóloga ao *blaR1*, codifica um anti-repressor e o gene *mecI*, de função homóloga ao do *blaI*, codifica um repressor (Figura 4). O fluxo de sinalização pode ser visualizado na Figura 3, substituindo os genes homólogos descritos na Figura 4.

A PBP2a possui função similar a da enzima PBP, porém com baixa afinidade às penicilinas. Dessa forma a produção da parede de peptidoglicano não é prejudicada quando a célula é exposta a droga.

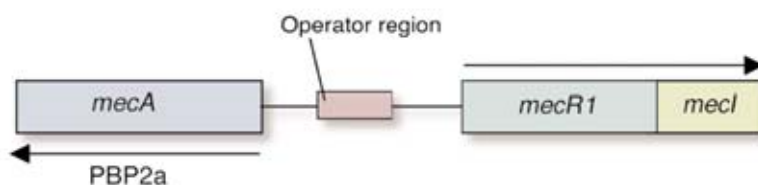


Figura 4. Complexo do gene *mec*. A estrutura de regulação do gene *mecA* é similar ao do gene *blaZ*, que produz a β-lactamase (Figura 3). Apesar da semelhança na cadeia de sinalização e do objetivo desses genes, o meio pelo qual eles conferem resistência à bactéria são muito diferentes.

Fonte: Lowy *et al.* (2003) [7].

O gene *mecA*, ao contrário do gene *blaZ*, está localizado no cromossomo, em uma ilha genômica chamada *SCCmec* (*Staphylococcal Cassete Cromossomal mec* ou Cassete Cromossomal *mec* de *Staphylococcus*) [17]. Oito famílias de ilhas genômicas foram identificadas em *S. aureus*, todas caracterizadas pela presença de genes de virulência, com a exceção do *SCCmec* que se restringe a genes de resistência a antibióticos [17].

Basicamente foram caracterizados quatro tipos de *SCCmec*, variando de 21 a 67 Kb [34] (Figura 5). Essa classificação é baseada nas combinações dos tipos do complexo do gene *mec*, responsável pela resistência à metilina, e do complexo do gene *ccr*, que é responsável pela mobilidade e inserção específica da ilha (Figura 5). A caracterização dos subtipos de *SCCmec* é realizada através de diferenças da região J, que entre diversos pseudo-genes de significância duvidosa, possui genes de resistência a antibióticos não β -lactâmicos e metais pesados originados de transposons ou plasmídeos (Tabela 2) [17].

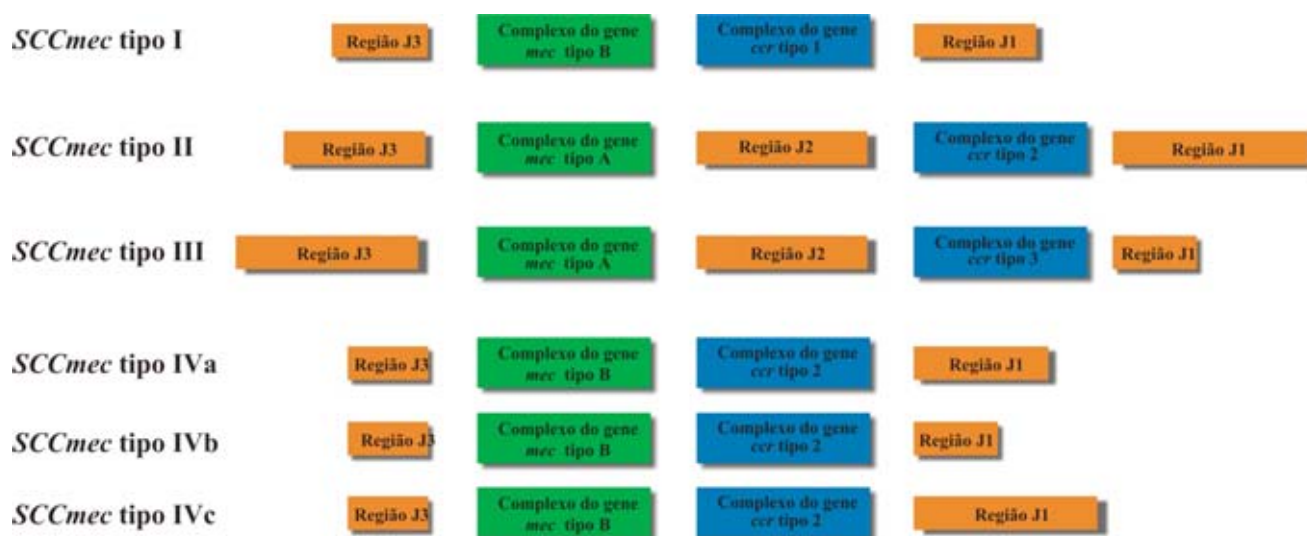


Figura 5. Estrutura e classificação dos tipos de *SCCmec*. Os genes de resistência aos antibióticos não β -lactâmicos estão inseridos nas regiões J. As diferenças quanto ao padrão de resistência de cada tipo e subtipo estão expressas na Tabela 2.

Aparentemente, a origem do gene *mecA* está relacionada a *Staphylococcus coagulase* negativos [35], visto que foi detectada em *S. sciuri* susceptível, uma proteína com similaridade de 80% na seqüência de aminoácidos à proteína codificada pelo gene *mecA* e, sua transdução ao *Staphylococcus aureus* susceptível à metilina (MSSA - Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*), aumentou a resistência desse microorganismo à droga e possibilitou a detecção da produção de PBP2a [36].

Tabela 2. Tipos de *SCCmec* e padrões de resistência à antibióticos.

Tipo <i>SCCmec</i>	Tipo <i>mec</i>	Tipo <i>ccr</i>	Resistência aos antibióticos:
I	b	1	Meticilina
II	a	2	Meticilina, Kanamicina, Eritromicina
III	a	3	Meticilina, Tetraciclina, Eritromicina, e Cadmium
IVa	b	2	Meticilina
IVb	b	2	Meticilina
IVc	b	2	Meticilina

O antibiótico vancomicina é muitas vezes considerado a última arma contra alguns microorganismos multi-resistentes [7]. Contudo, sua descoberta remonta a 1952, quando o laboratório “Eli Lilly”, determinado a encontrar novas opções de antibióticos eficazes contra microorganismos resistentes a penicilina, enviou missionários a vários locais do mundo em busca de amostras do meio ambiente. Uma amostra de solo oriunda de Bornéu continha uma bactéria, posteriormente identificada como *Streptomyces orientalis*, que produzia uma substância capaz de inibir o crescimento *in vitro* de diversas espécies bacterianas, incluindo *Clostridium sp.*, *Neisseria gonorrhoea* e *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina [37].

Apesar da aprovação americana para o uso do medicamento em 1958, seu uso somente foi difundido após 1980. O primeiro isolado clínico resistente a esse medicamento foi isolado em 1986 na Europa, e em 1987 nos EUA [38]. Microorganismos do gênero *Enterococcus* isolados de pacientes apresentaram resistência ao tratamento com vancomicina. Posteriormente, análises moleculares revelaram 6 genes individualmente capazes de gerar resistência ao medicamento: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG* [39-40] (Figura 6).

O primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina foi reportado nos Estados Unidos, em 2002 [41] Essa cepa possuía o gene *vanA*, provavelmente adquirido de uma cepa de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) [7].

A vancomicina atua impedindo a ligação cruzada entre os polímeros de NAM e NAG da parede de peptidoglicano. Ao contrário das drogas β -lactâmicas, a vancomicina não inativa a enzima responsável por essa ligação. A vancomicina liga-se à extremidade D-Ala-D-Ala do precursor da cadeia tetrapeptídica, impedindo a posterior ligação cruzada. O produto do gene *vanA* promove uma alteração na terminação do precursor da cadeia tetrapeptídica: de NAM-DAla-DGlu-Lys-DAla-DAla para NAM-DAla-DGlu-Lys-DAla-DLac. Essa alteração reduz a afinidade com a vancomicina (Figura 6), mas não prejudica a ligação cruzada, mantendo a rigidez da parede celular (Figura 7) [37, 42].

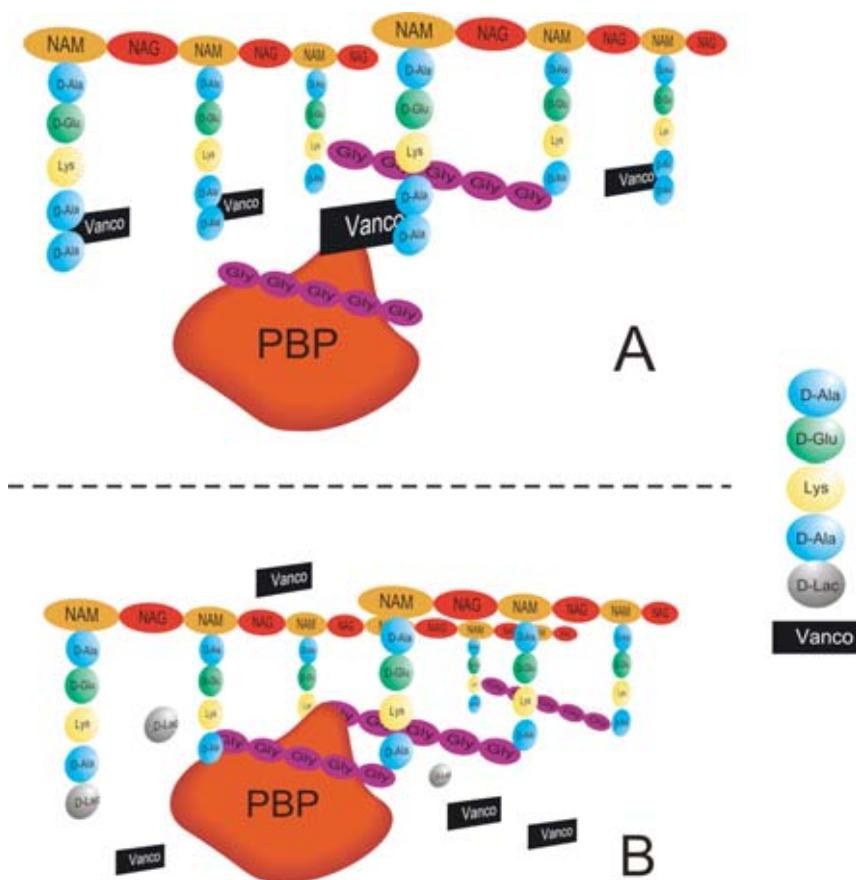


Figura 6. (A) Ação da vancomicina na formação da parede celular de peptidoglicano e (B) mecanismo de resistência mediado pelo gene *vanA*. A substituição do resíduo D-Ala por D-Lac no último resíduo do precursor da cadeia tetrapeptídica, reduz a afinidade da vancomicina, sem prejudicar na ligação cruzada entre os polímeros de NAM-NAG.

1.2.4 *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e a Infecção Hospitalar

A preocupação da comunidade médica e científica acerca da emergência de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos remonta desde o início do uso desses medicamentos, quando foi isolada a primeira cepa produtora de β -lactamase [7-8]. Essa preocupação foi se intensificando à medida que novos mecanismos de resistência acompanhavam o lançamento de novos antibióticos [7, 18, 22]. Contudo, a população esteve sempre alheia a esses fatos, até que, após a disseminação de *S. aureus* resistente à vancomicina, essa preocupação atingiu o cidadão comum [16].

Rotulado como “*The hospital superbug*” pela mídia dominical inglesa, o controle de MRSA foi amplamente discutido durante as eleições gerais de 2005 no Reino Unido, sendo assunto comum na pauta de debates entre os candidatos [16]. De fato, a Inglaterra possuía a pior taxa de infecção por MRSA na Europa, no início do século XXI [43]. Dentre todas as infecções hospitalares registradas na Inglaterra, mais de um quinto são causadas por

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina [20] e o número de mortes por essas infecções sofreu um aumento de 122% entre 2001 e 2005.

Apesar de nenhum outro país ter tido um apelo tão grande na mídia comum [16], a comunidade médica e científica mundial partilha da mesma preocupação em relação à disseminação e prevalência de *S. aureus* multi-resistentes [28]. Em uma recente pesquisa que incluía hospitais dos EUA, Canadá e Europa foi verificado que *S. aureus* era responsável por 22% das infecções sangüíneas (8.929 de 40.497), 23,2% das infecções do trato respiratório (3.371 de 14.552), e 39,2% (2.928 de 7.474) das infecções de pele e mucosas [19]. A mortalidade decorrente de infecções por *S. aureus* varia de 20% a 40% [7]. Na maioria dos casos, estes quadros começam como uma infecção local que ganha acesso à corrente sangüínea, levando o paciente ao risco de desenvolver endocardites, sepse e outras complicações metastáticas [14].

Por causa do número de tipos de infecções causadas por *S. aureus*, o prognóstico também varia. No Reino Unido, no período de 2001 a 2004, foi relatado que 21,8% dos indivíduos atendidos em hospitais com infecções causadas por *S. aureus* de origem comunitária faleceram (dados do *General Practice Research Database*) [45]. Em relação a infecção sangüínea, um estudo realizado nos EUA constatou que a mortalidade nos casos de sepsis nosocomial causado por MRSA era de 49,8% [44].

Além do custo humano, é importante ressaltar o custo econômico relacionado à disseminação dessas cepas resistentes. Um dos fatores que mais contribuem ao custo da prevalência de MRSA em um hospital é o aumento da permanência do paciente [46-47]. Em um hospital universitário alemão, a média de permanência dos 22.400 pacientes internados anualmente é de 8,4 dias. Entre os pacientes que contraem bacteremia por MRSA, a média sobe para 39,9 dias [47].

Uma comparação realizada em um hospital nos EUA, revelou que entre as infecções causadas por cepas de *S. aureus* sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) à meticilina, as bacteremias causadas por MRSA possuem tendência de prolongar a permanência do paciente no hospital em 40%, e de aumentar o custo do tratamento em pelo menos 32% [48]. Um hospital universitário na Finlândia contabilizou o custo de um surto de MRSA de 14 meses de duração em U\$ 1.279.385,00 apenas para o tratamento dos pacientes e controle do surto, desconsiderando a perda na receita do hospital devido a 11 leitos que foram fechados por um período de 112 dias. Neste surto ocorreram 114 infecções por MRSA [49].

O custo da erradicação de MRSA no ambiente hospitalar é elevado, em um hospital escola na Suécia, foram gastos U\$ 2.266.605,00 em uma política radical de erradicação

(*Search and Destroy Intensive MRSA Control Programme*), que levou 20 meses e que demonstrou ser financeiramente vantajosa após 24 meses sem casos de infecção hospitalar por MRSA [46]. Uma estratégia diferente foi adotada por um hospital alemão, que optou pela manutenção da prevalência de MRSA a 1%, sendo gasto nessa política em torno de US\$ 1.729.000,00 [47]. Embora dispendiosas, todas as políticas de controle e erradicação de MRSA demonstraram ser financeiramente vantajosas [46-50].

Dois fatores são importantes ao fazer o controle de um surto: a identificação rápida das amostras coletadas e a análise dos clones prevalentes [51-54].

A identificação de MRSA deve ser rápida para evitar uma disseminação das cepas resistentes pelo hospital. O isolamento de pacientes MRSA positivos é recomendado em diversos países, porém se for realizado após dois dias ou mais da admissão do portador de MRSA pode se tornar ineficiente na contenção da disseminação dessas cepas [20]. Contudo, caso o portador seja isolado em no máximo um dia após a admissão, a transmissão de MRSA é consideravelmente reduzida [54]. Essa velocidade no diagnóstico está sendo otimizada pelo desenvolvimento de metodologias de PCR para identificação das amostras [12, 20, 21, 30, 51-60]

A análise de clones prevalentes é fundamental para o controle de surtos e da erradicação de clones epidêmicos [21, 46, 53]. Em geral, surtos são produzidos por clones com grande capacidade de disseminação e de causar infecção [58-60]. Alguns clones possuem prevalência tão marcante que em pouco tempo se disseminam por vários hospitais de um país, como ocorreu com os clones USA300, nos EUA [61], Mu3 e Mu50 no Japão [56], EMRSA-15 e EMRSA-16 na Europa [58] e BEC no Brasil [59-60]. A identificação do padrão de clonalidade das cepas responsáveis por um surto são importantes pois podem levar à identificação dos reservatórios de células que podem estar influenciando na manutenção e disseminação dos clones prevalentes [21]. Através da análise desses padrões, foi possível por exemplo, identificar contaminação na casa de um funcionários pelo mesmo clone responsável por um longo surto epidêmico em um hospital alemão. O surto só foi controlado após a descontaminação dos funcionários, suas residências e itens pessoais [21]. Em outro caso, foi possível identificar o responsável pela introdução de um clone epidêmico europeu em um hospital sueco [46], e no Brasil, a análise do padrão polimórfico do DNA demonstrou a disseminação inter-hospitalar do clone epidêmico brasileiro [59]. Duas técnicas são muito utilizadas para realizar essas análises: RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) [62-65]. O PFGE é uma técnica mais antiga, onde o padrão polimórfico de DNA é gerado pela digestão do DNA por uma enzima de restrição rara,

usualmente a *smal*. É uma técnica muito eficiente na identificação de disseminação inter-hospitalar, mas demanda muito tempo de trabalho laboratorial especializado e possui um alto custo experimental. A técnica de RAPD por outro lado é mais simples, rápida e barata. Contudo, até o momento as investigações utilizando esta técnica estão limitadas ao uso intra-hospitalar devido as diferentes condições empregadas em cada instituição.

Essas técnicas foram úteis para trazer novamente a questão sobre o papel do profissional de saúde na disseminação de infecção hospitalar. Apesar de não ser confirmado se esse profissional realmente contribui [22, 66], diversos trabalhos com base em técnicas moleculares descritas sugerem que profissionais, médicos e mais recentemente alunos [21, 62-65, 67-77] são veículos importantes na disseminação de clones epidêmicos.

1.2.5 Infecção Hospitalar no Brasil

Confirmando a tendência internacional dessa espécie de gerar clones com alta capacidade de disseminação e patogenicidade, foi descrito no Brasil um clone epidêmico regional, posteriormente denominado BEC, *Brasilian Epidemic Clone*. A caracterização foi realizada em 1995 por Texeira *et al.* [59] a partir de 152 cepas isoladas em hospitais do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Amazonas. Poucos anos depois da publicação que descrevia este clone, outros hospitais da América do Sul, Europa e China identificaram cepas com o mesmo perfil gênico, caracterizando sua disseminação global [78-84].

Apesar deste clone dominar a grande maioria dos hospitais brasileiros, outros clones epidêmicos também são freqüentemente isolados em hospitais do Brasil, como o clone Ny/Jp, descrito no Japão e Estados Unidos [85]. A disseminação em escala global sugere a participação de indivíduos da comunidade como portadores e transmissores indiretos dessas cepas. Tal fato gera a preocupação da dispersão de MRSA na população que não possui contato com o hospital, o que, sem dúvida, pode estar acontecendo. Em um estudo realizado em Goiânia, no centro oeste brasileiro, amostras de 686 crianças da comunidade foram analisadas, resultando na identificação de 7 (1,02%) portadores de MRSA multi-resistente (*SCCmec* tipo 3: Figura 5, Tabela 2) [86]. Apesar de o número de portadores de MRSA ser baixo, é importante ressaltar que essas crianças não possuíam contato prévio com o hospital, o que pode significar uma disseminação para comunidade.

Com o aumento do número de infecções causadas por MRSA, aumenta também o uso de vancomicina, em muitos casos a única droga ainda efetiva contra essas cepas. Contudo, o aumento da pressão seletiva levou ao isolamento, em 1997, da primeira cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina no Japão e, em 2000, no Brasil [56, 87]. Apesar do relato de outros

países sobre o isolamento de cepas resistentes à vancomicina, nenhum indício de clonalidade entre os isolados foi encontrado [117].

1.2.6 MRSA nos Hospitais Universitários Brasileiros

Os trabalhos publicados em hospitais universitários brasileiros relatam principalmente a ocorrência de surtos [88], colonização de pacientes [89] e colonização da equipe [78, 90].

Em um estudo realizado em um hospital universitário em Londrina, a colonização por *S. aureus* em membros da equipe médica foi próxima à normalmente encontrada na comunidade: 17,68%, sendo 1,19% portadores de MRSA [90]. Em Goiânia, foi relatada uma alta frequência de portadores de *S. aureus* na equipe médica, 84,7%, sendo 9,7% portadores de MRSA [78]. Nesse mesmo hospital, a média de casos de sepse causada por MRSA em indivíduos acima de um ano de vida foi de cinco para 1000 pacientes admitidos, correspondendo a 111 casos em 48 meses de estudo (janeiro de 2000 a dezembro de 2001). A taxa de mortalidade nesses casos foi de 35,1% [88]. Em países desenvolvidos, a ocorrência de sepse nosocomial raramente ultrapassa 1,5 por 1000 pacientes admitidos [91-92], mas a taxa de mortalidade relatada é de até 40% [7, 9, 28, 34, 93].

No Hospital Universitário de Uberlândia foi realizado um estudo acerca da colonização de neonatos, onde foi verificado que 30 dos 143 nascidos durante os três anos de estudo estavam colonizados por MRSA. Contudo apenas nove destes foram efetivamente infectados [89].

2 - OBJETIVOS

A primeira proposta deste trabalho foi realizar um levantamento de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* com ou sem resistência à oxacilina e à vancomicina entre funcionários e alunos do Hospital Universitário de Brasília, abrangendo o maior número de classes profissionais e identificando assim quais os grupos poderiam estar envolvidos na disseminação de clones epidêmicos. A segunda proposta foi padronizar um protocolo para identificação molecular de *S. aureus* e de genes de resistência à antibióticos, sugerindo assim uma metodologia alternativa para um diagnóstico mais rápido e preciso.

Dessa forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

- Levantamento da ocorrência de indivíduos portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) dentre alunos e funcionários do Hospital Universitário de Brasília.

- Padronizar um protocolo de procedimentos moleculares visando a identificação de *Staphylococcus aureus* e de genes de resistência aos antibióticos oxacilina e vancomicina.

3 - METODOLOGIA

3.1 Local e período do estudo

Este estudo foi realizado com amostras obtidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) ao longo do ano de 2006, com a exceção do grupo controle, que foram coletadas junto à comunidade de Brasília no início de 2008.

As coletas executadas no HUB foram realizadas em setores específicos do hospital. Os principais locais e o período de coleta são descritos abaixo, juntamente à caracterização dos respectivos grupos amostrados.

3.2 Caracterização dos grupos amostrados

Para caracterizar o perfil dos portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* com ou sem resistência à oxacilina e à vancomicina no âmbito do HUB, cinco grupos de indivíduos foram analisados neste estudo: alunos, técnicos, equipe médica, pacientes e comunidade. As características de cada um destes grupos são descritas a seguir.

3.2.1 Alunos

Indivíduos regularmente matriculados nos cursos de medicina, enfermagem ou odontologia da Universidade de Brasília, cursando disciplinas ministradas totalmente, ou em parte, no ambiente do HUB. As amostras foram coletadas durante o período letivo de 2006 em salas de aula no campus da UnB.

3.2.2 Comunidade

Indivíduos que residiam em Brasília, Distrito Federal, há pelo menos 2 anos e que não possuíam qualquer familiar ou amigo próximo que trabalhasse ou tivesse sido internado por mais de um mês, no último ano em um hospital, clínica ou laboratório de microbiologia ou de análises clínicas. As amostras foram coletadas durante os meses de Janeiro e Fevereiro de 2008 em dois cursos preparatórios para concursos, nos três turnos de aula.

3.2.3 Equipe médica

Profissionais que atuassem no Hospital Universitário de Brasília, em contato direto com

os pacientes. Foram enquadrados nesta categoria: médicos, enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem. As amostras foram coletadas entre Janeiro e Setembro de 2006 principalmente nos setores: UTI, Clínica Cirúrgica, Centro Cirúrgico e Pediatria

3.2.4 Pacientes

As amostras deste grupo foram obtidas a partir de hemocultura e pontas de cateter de indivíduos internados em qualquer setor do HUB. As amostras foram coletadas entre Janeiro e Setembro de 2006 pela equipe do HUB e fornecida pelo laboratório de microbiologia do HUB após o procedimento rotineiro de identificação do microrganismo causador do processo infeccioso. Todas os isolados fornecidos foram identificadas pelo laboratório do hospital como *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (ORSA). A fim de confirmar a identificação e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as amostras foram submetidas aos mesmos testes de caracterização realizados com as amostras dos outros grupos.

3.2.5 Técnicos

Profissionais que atuassem no HUB sem contato direto com pacientes, podendo exercer função na área administrativa, na higienização do hospital (UTI, Clínica Cirúrgica e Pediatria) na lavanderia, no refeitório, ou alocados em serviços gerais do hospital. As amostras deste grupo foram coletadas entre Janeiro e Setembro de 2006.

3.3 Critérios de exclusão.

Para evitar que as amostras coletadas não representassem corretamente os grupos estudados, alguns critérios foram determinados para selecionar os voluntários desse estudo. As informações necessárias para inclusão ou exclusão de determinado indivíduo em cada grupo foram obtidas por meio de entrevista e formulário de identificação (Apêndices A e B), a ser preenchido pelo voluntário.

Foram excluídas do estudo as amostras de pacientes fornecidas pelo HUB que, pela metodologia proposta neste estudo, não confirmaram a identificação inicial feita pelo hospital.

3.4 Consentimento livre e esclarecido.

Todas as amostras coletadas neste estudo foram fornecidas por livre e espontânea

vontade. Todos os doadores possuíam conhecimento dos objetivos desta pesquisa e consentiram com a utilização das amostras para as análises e procedimentos necessários, de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C).

3.5 Apreciação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Antes do início deste estudo, o projeto foi apreciado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sendo aprovado conforme o parecer em anexo (Anexo A)

3.6 Meios de cultura

Durante a realização do estudo, os seguintes meios de cultura foram utilizados:

Meio Baird Parker (Acumedia)

Meio base:

Peptona de caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de carne	0,5 % (p/v)
Extrato de levedura	0,1 % (p/v)
Piruvato de sódio	1.0 % (p/v)
Glicina	1,2 % (p/v)
Cloreto de lítio	0,5 % (p/v)
Ágar bacteriológico	1,5 % (p/v)

Água destilada

pH final (a 25°C) $7,0 \pm 0,1$

Esterilizado em autoclave, a 121°C/1 atm/20 min

Suplemento:

Emulsão de gema de ovo com

telurito de potássio 5,0 % (v/v)

O meio base foi preparado conforme as instruções do fabricante, esterilizado e após resfriamento a aproximadamente 45°C, adicionava-se o suplemento, sob condições assépticas.

Caldo Luria-Bertani (LB)

Peptona de caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)
Água destilada	
pH final (a 25°C)	7,2 ± 0,1
Esterilizado em autoclave, a 121°C/1 atm/20 min	

Ágar Luria-Bertani (LB)

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a	1,5 % (p/v)
pH final (a 25°C)	7,2 ± 0,1
Esterilizado em autoclave, a 121°C/1 atm/20 min	

Meio Manitol-Sal ágar (Acumedia)

Peptona Proteose	1 % (p/v)
Extrato de Carne	0,1 % (p/v)
Cloreto de Sódio	7,5 % (p/v)
D-Manitol	1,0 % (p/v)
Vermelho Fenol	0,0025 % (p/v)
Ágar bacteriológico	1,5 % (p/v)
Água destilada	
pH final (a 25°C)	7,4 ± 0,2
Esterilizado em autoclave, a 121°C/1 atm/20 min	

O meio foi preparado conforme as instruções do fabricante, esterilizado e após o resfriamento a aproximadamente 60°C, foi vertido em tubos que foram mantidos inclinados até seu resfriamento.

Ágar Mueller Hinton ágar (Acumedia)

Extrato de carne	0,20 % (p/v)
Caseína ácida hidrolisada	1,75 % (p/v)
Amido	0,15 % (p/v)

Ágar bacteriológico 1,5% (p/v)

Água destilada

pH final (a 25°C) $7,3 \pm 0,1$

Esterilizado em autoclave, a 120°C/1 atm/20 min

Meio para análise da atividade de coagulase

Plasma de sangue de coelho (Coagulasma - Laborclin) 50 % (v/v)

Inóculo em LB com 18 horas de crescimento 50 % (v/v)

O Plasma de sangue de coelho liofilizado foi diluído com solução fisiológica estéril, conforme instruções do fabricante

3.7 Soluções, tampões e enzimas.

As seguintes soluções, tampões e enzimas foram utilizados:

Clorofil

Clorofórmio 24 v

Álcool Isoamílico 1 v

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE e estocado ao abrigo da luz.

Fenol Saturado (BioAgency)

Fenol 1,0 v

8-hidroxiquinolina 0,1 % (p/v)

Saturado com tampão TE. Estocado a 4 °C protegido da luz.

pH final (a 25°C) $7,6 \pm 0,3$

Glicerol 70%

Glicerol 70 % (v/v)

Água destilada 30 % (v/v)

Esterilizado em autoclave, a 121°C/1 atm/20 min

Solução de Brometo de Etídio

Brometo de Etídio	10 mg/mL
Água destilada qsp	5 ml

Solução Fisiológica

Cloreto de Sódio	0,9 % (p/v)
Água destilada qsp	500 ml

Tampão de Amostra (10X) para eletroforese em gel de agarose

Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno de cianol	0,1 % (p/v)
Água destilada qsp	15 ml

Tampão de Corrida Tris-Borato -TEB (10X)

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M
Água destilada qsp	1000 ml
pH final: 8,0	

Tampão TE

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA, pH 7,5	10 mM
Água destilada qsp	50 ml

Enzimas

Taq DNA polimerase – 5U/μl (Invitrogen Life Technologies)

Taq DNA polimerase – 5U/μl (Phoneutria)

Taq DNA polimerase – 5U/μl (CENBIOT - RS)

Marcadores de massa molecular (MM)

1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen Life Technologies – N° de catálogo: 10787-018) – fragmentos de 100 a 12000 pb.

TTSS *Ladder* (Confeccionado no lab. de microbiologia) fragmentos de 250 a 1200 pb correspondentes a genes do sistema de secreção tipo III (TTSS) da linhagem E2346/69 de *Escherichia coli*.

3.8 Procedimentos experimentais

3.8.1 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas empregando-se *swabs* estéreis, umedecidos em solução de NaCl 0,9% estéril.

Duas amostras foram coletadas de cada indivíduo, uma nasal e uma sub-ungueal (exceto no grupo Pacientes). As amostras nasais foram coletadas friccionando o *swab* na região anterior da fossa nasal. As amostras sub-ungueais foram coletadas do primeiro dígito da mão direita dos indivíduos destros, ou na esquerda, caso o indivíduo fosse canhoto.

Após a coleta, os *swabs* foram mantidos em tubos contendo solução fisiológica por no máximo 12 horas, sendo então inoculados em meios de cultura seletivos e diferenciais, para o isolamento e caracterização presuntiva, os quais foram confirmados por meio de testes bioquímicos.

A estratégia de coleta e transporte foi testada quanto à taxa de recuperação de *S. aureus* no início do estudo. Para tanto, após as amostras terem sido coletadas, estas eram levadas ao laboratório e inoculadas nos meios de cultura adequados, em um prazo máximo de 12 horas. Testes de inoculação realizados após períodos superiores a 12 horas revelaram que o prazo máximo adotado não influenciou a taxa recuperação das amostras.

3.8.2 Isolamento

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília e inoculadas diretamente em placas de Petri de 10ml contendo o meio de cultura Baird Parker (BP) enriquecido com uma emulsão de ovo contendo telurito de potássio, e incubadas a 37°C por 24 horas.

3.8.3 Caracterização bioquímica

As colônias com crescimento característico em BP foram então selecionadas e submetidas a dois testes com o intuito de confirmar a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*: crescimento em ágar manitol-sal, com produção de ácido a partir da fermentação de manitol e o teste da coagulase em tubo.

3.8.3.1 Fermentação de Manitol

Para o teste de fermentação de manitol, foi utilizado o meio de cultura ágar manitol-sal em tubo inclinado (Figura 3.2). As colônias isoladas em Baird Parker foram inoculadas em caldo Lúria-Bertani (LB) e incubadas por 24 horas a 37°C sem agitação. Em seguida, uma alíquota do crescimento foi inoculada com uma alça de platina nos tubos contendo ágar manitol-sal, e incubadas nas mesmas condições de temperatura e tempo.

3.8.3.2 Produção de Coagulase

O plasma liofilizado foi diluído em 3 ml de solução salina estéril, de acordo com as instruções do fabricante, sendo então transferida uma alíquota de 0,5 ml a um tubo contendo o mesmo volume de uma cultura em LB (caldo) da amostra suspeita, previamente cultivada por 18 horas a 37°C. O sistema foi incubado a 37°C, e as leituras realizadas após 4 e 24 horas de incubação, verificando-se a ocorrência de formação de coágulo.

Foram considerados portadores de *S. aureus* todos os indivíduos que tiveram amostras positivas neste teste, seja sub-ungueal e/ou nasal.

3.8.4 Caracterização do perfil de sensibilidade à oxacilina e à vancomicina

Para a realização deste teste, as amostras foram inicialmente cultivadas em caldo LB, a 37°C por uma noite. Em seguida, foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton e incubadas novamente a 37°C por 24 horas. A partir de uma área com crescimento homogêneo desta placa, um inóculo foi retirado e testado em placas de Ágar Mueller Hinton contendo a droga a ser testada incorporada.

Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), cada amostra foi inoculada em 6 placas contendo diferentes concentrações da droga a ser estudada: 0, 2, 4, 6, 8 e 16 mg/l .

Cada placa de Petri de 20ml possuía um *grid* de 52 campos, sendo 48 campos destinados às amostras, 1 campo para o controle negativo, a linhagem de *S. aureus* ATCC 29213, e 3 controles positivos, isolados de pacientes do HUB e caracterizados previamente como MRSA.

O MIC foi determinado após 24 horas de incubação a 37°C, pela ausência de crescimento na menor concentração de antibiótico testado.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8.5 Manutenção das linhagens bacterianas

Após o isolamento e a identificação bioquímica, as amostras foram armazenadas em meio LB contendo 35% de glicerol, a -20°C. Sempre que necessário, alíquotas de 60 a 100 µl foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37°C, por uma noite.

3.8.6 Extração e purificação de DNA total

Resumidamente, o protocolo consiste em (escala de 3,0 mL de cultura):

1. A partir de uma cultura inoculada em 5 mL de LB e incubada a 37°C por uma noite, transferir cerca de 1,5 mL da culturas para tubos tipo *ependorf* e centrifugar a 6000 RPM por 6 min. Descartar o sobrenadante;
2. Repetir o mesmo procedimento;
3. Ressuspender o sedimento em 200 µl de tampão TE;
4. Adicionar 20 µl de lisozima 100mg/ml e incubar no gelo por 15 min.;
5. Adicionar 200 µl de fenol hidratado;
6. Homogeneizar em vórtex por 5 seg.;
7. Centrifugar 6000 RPM /6 min.;
8. Coletar a fase aquosa e transferir para um tubo novo;
9. Adicionar 200 µl de Clorofil;
10. Homogeneizar suavemente invertendo o tubo;
11. Centrifugar a 6000 RPM /6 min.;
12. Transferir a fase aquosa para um tubo novo;
13. Adicionar NaCl 5M para uma concentração final de 0,3M;

14. Homogeneizar suavemente invertendo o tubo;
15. Adicionar 2,5 volumes de etanol 100% gelado;
16. Homogeneizar suavemente invertendo o tubo;
17. Incubar durante a noite à -20°C;
18. Centrifugar a 13000 RPM /20 min.;
19. Descartar o sobrenadante;
20. Lavar o sedimento com 500 µl de etanol 70% gelado;
21. Centrifugar a 13000 RPM /20 min.;
22. Descartar o sobrenadante;
23. Deixar o sedimento secar;
24. Ressuspender em 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5;
25. Armazenar a -20° C.

Todos os procedimentos de extração de DNA foram realizados utilizando três controles: *S. aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis*, e *Escherichia coli*. Após o término do protocolo de extração, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi analisada em ensaio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio. As amostras que não apresentavam bandas referentes ao DNA cromossomal foram novamente submetidas à extração de DNA.

3.8.7 Ensaio de PCR

Durante o desenvolvimento deste trabalho, ensaios de PCR foram realizados em diversas condições, a fim de obter-se uma melhor eficiência e maior confiabilidade nos resultados. Abaixo são descritas as condições gerais empregadas.

Na primeira etapa, foram determinados os genes alvo, seguido da construção e síntese dos iniciadores (Tabela 3). A determinação da seqüência dos iniciadores foi realizada utilizando os softwares “CLC Combined Workbench” versão 4.0, produzido pela “CLC Bio”, e o software “Primer!” versão 1.0, produzido pela “Apple PI Software”. Os genes codificadores da enzima coagulase, da proteína A e da nuclease termoestável foram escolhidos em função da especificidade, com o intuito de gerar produtos de amplificação apenas na espécie em estudo. Os iniciadores cujos alvos são genes codificadores de enzimas relacionadas à resistência à

antibióticos (*mecA* e *vanA*) foram definidos de forma a abordar todos os subtipos já encontrados desses genes na espécie em estudo.

Tabela 3. Lista dos iniciadores utilizados, seqüências nucleotídicas e tamanho do fragmento esperado para cada par.

Iniciador	Seqüência	Tamanho do produto
coag-for	5' - TTA TTG ATG ATT TCT TTA TGG - 3'	719 pb
coag-rev	5' - ACG GAT ACC TGT ACC AGC - 3'	
ptnA-for	5' - GAC GAT CCT TCA GTG AGC- 3'	478 pb
ptnA-rev	5' - ACA ACA AGT TCT TGA CCA GG- 3'	
nuc-for	5' - TAA TTA AAG CGA TTG ATG GTG- 3'	306 pb
nuc-rev	5' - TAA ACA TAA GCA ACT TTA GCC - 3'	
<i>mecA</i> -for	5' - TGC TAT CCA CCC TCA AAC - 3'	906 pb
<i>mecA</i> -rev	5' - CCT GAG ATT TTG GCA TTG - 3'	
<i>vanA</i> -for	5' - AGT TGC AAT ACT GTT TGG G - 3'	694 pb
<i>vanA</i> -rev	5' - GCC TGA TTT GGT CCA CC - 3'	

Os experimentos de PCR foram realizados em um termociclador MJ, empregando sistemas com um volume final de 30 µl contendo:

DNA	50 ng
Tampão de reação	1X
MgCl ₂	2,5 mM
Iniciador A	0,3 µM
Iniciador B	0,3 µM
dNTPs	0,2 mM
Taq DNA polimerase	1,5U/sistema

As condições empregadas nos ensaios de PCR encontram-se descritas abaixo, sendo que para os diferentes pares de iniciadores e DNAs moldes, as temperaturas de anelamento variaram de 48 a 55°C.

- 1 - Desnaturação a 95°C/2 min.
- 2 - Desnaturação a 95°C/1 min.
- 3 - Anelamento 45-55°C/1 min.
- 4 - Extensão a 72°C/1 min.
- 5 - Repetição das etapas 2 a 4 por 35 vezes
- 6 - Extensão a 72°C/5 min.
- 7 - Manutenção a 4°C

Os produtos resultantes dos diferentes ensaios foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio.

3.8.8 Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose

Para análise dos produtos das reações de PCR, foram realizados ensaios de eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados com 1% (p/v) de agarose em tampão TEB 1x, corado com brometo de etídio a uma concentração final de 0,4 µg/ml e fotografado sob ultravioleta (UV-B $\lambda = \pm 295$ nm).

3.9 Análises estatísticas

Foi realizado o teste estatístico χ^2 através do programa SPSS (versão 16.0 para Macintosh) com correção de Yates ou Fisher, para detectar correlações entre os dados dos diferentes grupos, considerando o nível de significância de 5%.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostragem

Foram coletadas 511 amostras de 269 indivíduos. As amostras foram organizadas em 5 grupos: Alunos, Técnicos, Equipe Médica, Pacientes e Comunidade (Tabela 5 e Gráfico 2).

Tabela 5: Número de amostras coletadas divididas por grupos

Grupo	Indivíduos	Amostras
Alunos	56	109
Equipe Médica	61	120
Técnicos	49	98
Comunidade	68	136
Pacientes	35	48
Total	269	511

Cinco amostras foram excluídas devido a erros em sua manipulação durante os experimentos, três de alunos e duas da equipe médica. Ocasionalmente, mais de uma amostra do mesmo paciente foi recebida, em geral nos casos de múltiplos focos de infecção ou em infecções recorrentes.

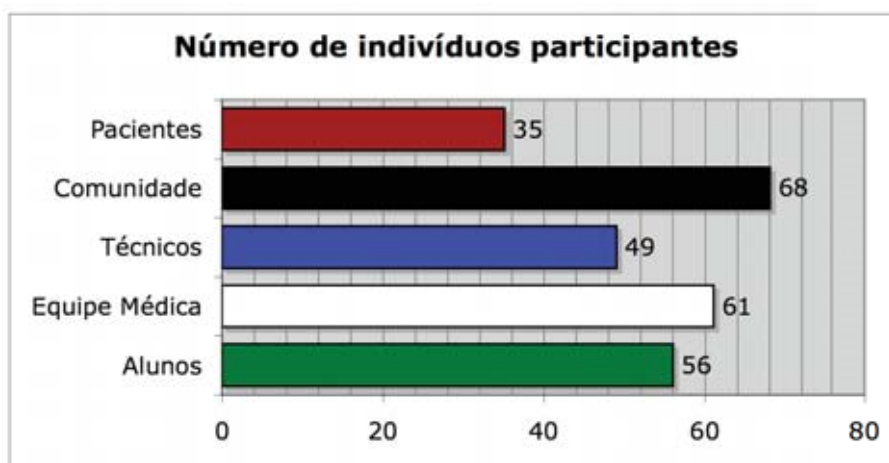


Gráfico 2: Número de indivíduos de cada grupo amostrado. Grupos de estudo: Alunos, Técnicos e Equipe Médica. Grupos controle: Comunidade (negativo) e Pacientes (positivo).

4.2 Caracterização microbiológica e bioquímica de *Staphylococcus aureus*

Todas as amostras foram submetidas aos mesmos testes e procedimentos visando o isolamento e caracterização de *Staphylococcus aureus*. As análises foram realizadas na seguinte seqüência: coleta, transporte, semeadura em BP, semeadura em manitol-sal, coagulase e teste de suscetibilidade à oxacilina e à vancomicina.

4.2.1 Primeiro inóculo: Ágar Baird Parker

Embora em vários de trabalhos relacionados à identificação de portadores assintomáticos de *S. aureus*, as amostras coletadas dos indivíduos são inoculadas diretamente em ágar manitol-sal [21, 73, 94-96], optamos por utilizar o meio BP como meio inicial de isolamento, uma vez que consideramos que, devido à sua composição química, o meio BP propiciaria condições menos drásticas para o isolamento das linhagens de *S. aureus*.

O meio de cultura Baird Parker (BP), é caracterizado pela inibição do crescimento de diversas espécies de bactérias Gram negativas e positivas. Devido à adição dos reagentes cloreto de lítio e telurito de potássio, além da adição de uma emulsão contendo gema de ovos, este meio de cultura seleciona principalmente *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Uma vez que cepas do gênero *Staphylococcus* são capazes de reduzir o composto telurito de potássio, suas colônias adquirem uma coloração diferencial, podendo variar de cinza claro a preto. Tanto as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* caracterizam-se pela coloração negra e brilhante. A diferenciação entre essas duas espécies ocorre devido à ação da enzima lecitinase, produzida por *S. aureus*, que atua sobre a emulsão de ovo, uma fonte de lecitina, produzindo um halo branco ao redor das colônias (Figura 8).

Os isolados que originavam colônias redondas, convexas, de coloração negra, brilhantes e com um halo branco ao redor foram selecionadas como prováveis linhagens de *S. aureus*, sendo então utilizadas nas etapas adicionais de caracterização presuntiva deste microrganismo.

Das 511 amostras testadas em BP, incluindo os grupos de estudo e dois grupos controle, 483 (94,5%) foram consideradas como positivas. Nos grupos de estudo, (Técnicos, Equipe Médica e Alunos), 94,5% (309 de 327) amostras foram positivas. No grupo Comunidade, 92,5% (126 de 136) foram positivas, e no grupo Pacientes, conforme o esperado, todas as 48 amostras foram positivas (Tabela 6).



Figura 7.: Colônias características do gênero *Staphylococcus* em meio de cultura Baird Parker.

Eventualmente, duas ou mais colônias provenientes de uma única amostra foram selecionadas. Estas colônias foram submetidas aos ensaios posteriores de forma independente e os resultados associados às amostras de origem.

4.2.2 Crescimento em ágar manitol-sal

O ágar manitol-sal é um meio seletivo e diferencial, também utilizado no isolamento e identificação presuntiva de *S. aureus*. A seletividade deste meio de cultura é decorrente da alta concentração de sal (7,5% de NaCl), que inibe o crescimento de diversas espécies, corrigindo assim, uma eventual seleção incorreta de uma colônia crescida em ágar Baird-Parker. A incorporação do indicador de pH vermelho fenol ao meio, torna-o de natureza diferencial, permitindo a verificação da fermentação do d-manitol. Quando ocorre a fermentação do manitol, a acidificação do meio de cultura resulta na produção de uma coloração amarela (Figura 9), típica de *S. aureus*. Esta propriedade possibilita a distinção de diversas espécies, incluindo *S. epidermidis*, que é o representante do gênero mais comum na microbiota humana [27]. Em alguns casos negativos, o meio adquire a coloração rosa devido a alcalinização gerada pela hidrólise de proteínas proveniente do extrato de carne ou da peptona.

A semeadura em meio manitol sal foi realizada com todas os isolados consideradas positivas em BP, visando a separação destas em dois grandes grupos: *Staphylococcus* manitol positivo e negativo. Foram consideradas como *S. aureus* aqueles isolados capazes de produzir ácido a partir da fermentação de d-manitol após

24 horas a 37°C.

Dos 483 isolados previamente selecionados em BP, 292 foram considerados positivos para *S. aureus*, o que representa 57,1% do total de amostras coletadas (511).

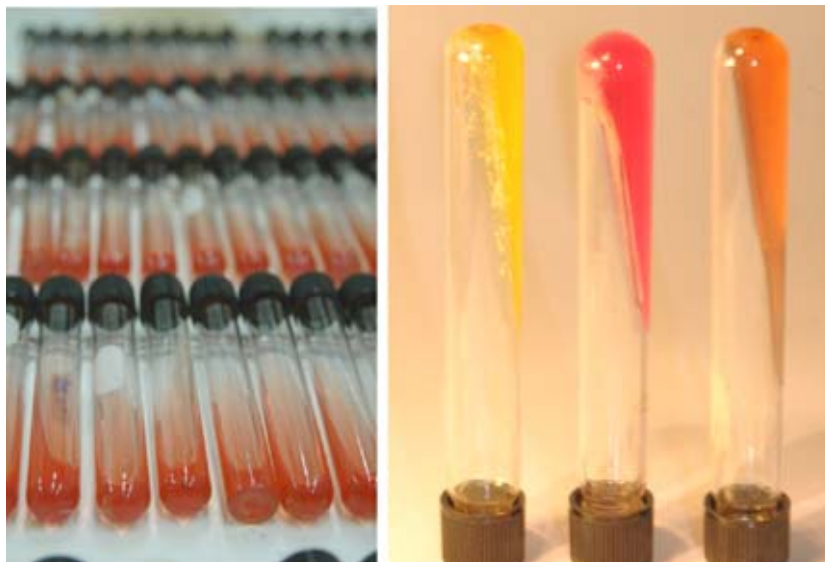


Figura 8. À esquerda, preparação do ágar Manitol-sal em tubo inclinado. À direita, uma comparação entre um resultado positivo (amarelo), um negativo (rosa) e um tubo não inoculado.

Em relação aos grupos estudados, os Alunos corresponderam a 63,3% (69 de 109) das amostras positivas, Equipe Médica 43,3% (52 de 120), Técnicos 65,3% (64 de 98), Comunidade 43,4% (59 de 136). Novamente, de acordo com o esperado, no grupo Pacientes todas as 48 amostras foram positivas (Tabela 6).

Estes resultados revelam a importância da semeadura em mais de um meio seletivo e diferencial, quando se tem por finalidade a identificação de *S. aureus*, a partir de um grande número de amostras. A utilização destes dois procedimentos indica que o meio BP é útil para um primeiro isolamento das linhagens bacterianas isoladas dos indivíduos, mas que a posterior semeadura em ágar manitol-sal, por suas características mais estridentes devido à alta concentração de NaCl, enriquecem os prováveis isolados de *S. aureus*.

Assim, os resultados obtidos nestas primeiras análises revelam que no grupo Alunos, 66,99% dos isolados previamente selecionados como *S. aureus* em meio de cultura Baird Parker, confirmaram tal identificação presuntiva. No grupo Equipe Médica, apenas 46,84% foram positivas nesta segunda avaliação. No grupo Técnicos, 46,82% foram positivas e no grupo Comunidade, apenas 46,82%. No grupo Pacientes,

todos os isolados presuntivamente identificadas como *S. aureus* no meio BP foram também positivas no Ágar Manitol-Sal.

Tabela 6: Isolados identificados presuntivamente como *S. aureus*, após as duas primeiras etapas de identificação em meios de cultura seletivos e diferenciais.

Grupo	Coletadas	Pos. em BP	Pos. Manitol
Aluno	109	103	69
Equipe Médica	120	111	52
Técnico	98	95	64
Comunidade	136	126	59
Paciente	48	48	48
Total	511	483	292

Apesar da fermentação de manitol ter sido utilizada como critério de identificação presuntiva de *S. aureus*, outras espécies de *Staphylococcus* podem também apresentar o caráter positivo de fermentação de manitol [27]. Algumas destas podem, eventualmente, estar associadas à infecções hospitalares, especialmente *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* [97-98]. Entretanto, de acordo com Koneman *et al* [27], dentre as espécies de *Staphylococcus* de importância médica, apenas *S. aureus* é capaz de produzir a enzima coagulase, alvo do próximo teste para caracterização microbiológica.

Assim, aqueles isolados capazes de crescer em manitol sal, promovendo a fermentação do açúcar (acidificação do meio), foram selecionados para a análise da presença de coagulase, uma característica tipicamente associada às espécies de *S. aureus*.

4.2.3 Coagulação de plasma de coelho

Esse ensaio foi utilizado como teste bioquímico confirmatório para a identificação de *Staphylococcus aureus* nos isolados selecionados.

De acordo com a literatura [27], somente cinco espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir a coagulação de plasma sanguíneo, na presença de anti-coagulantes. No entanto, tais espécies podem ser diferenciadas pela fermentação do manitol, onde apenas *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* produzem ácido na fermentação de d-manitol em 24 horas. Além disso, as espécies *S. schleiferi* e *S. intermedius* não colonizam o homem, sendo normalmente encontradas na microbiota de cães e cavalos [27]. Apesar de existirem relatos de isolamento dessas espécies em homens, estes correspondem a casos raros, nos quais os indivíduos

estabeleciam grande contato com os animais citados e as infecções não produziam grandes conseqüências como surtos, sepse ou óbitos [99-100].

Portanto, os isolados positivos em manitol-sal que produziram coágulo neste teste foram consideradas *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao número de amostras, no grupo Equipe Médica, dos 52 isolados presuntivamente caracterizados como *S. aureus*, 35 (67,30%) foram positivos; em Alunos, 51 de 69 (73,91%) foram positivos; em Técnicos, 35 de 64 (54,68%) foram positivos; no grupo Comunidade, 13 de 59 (22,03%) isolados foram positivos e no grupo Pacientes, 45 de 48 (93,75%) foram positivos (Tabela 7).

Tabela 7: Resultado do teste de coagulação de plasma de coelho, dos isolados previamente caracterizadas como *S. aureus*, em Ágar Manitol-Sal.

Descrição	Manitol-Sal Positivas	Coagulase Positivas
Aluno	69	51
Equipe Médica	52	35
Técnico	64	35
Comunidade	59	13
Paciente	48	45
Total	292	179

Novamente, os resultados obtidos indicam que o cultivo em meios seletivos e diferenciais são muito úteis na caracterização presuntiva de *S. aureus*, mas que, no entanto, não podem ser considerados definitivos, sendo necessária a realização do teste de coagulase para a confirmação da caracterização da linhagem em estudo como *S. aureus*.

Os dados resultantes do teste de coagulação revelam que dos vários isolados considerados positivos em ágar manitol-sal, um número menor foi definitivamente caracterizado como pertencente à espécie *S. aureus*.

Estatisticamente, a diferença entre o número de portadores de *S. aureus* do grupo Comunidade em relação a cada um dos outros grupos estudados é significativa ($P \leq 0,001$).

Desta forma, se considerarmos as amostras totais, inicialmente coletadas, verificamos que a frequência de amostras definitivamente identificadas como *S. aureus*, nos diferentes grupos analisados foi de: Alunos: 46,79%; Equipe Médica: 29,17%; Técnicos: 35,71%; Comunidade: 9,56%; Pacientes: 93,75% (Tabela 8 e apêndice D)).

Tabela 8: Número de amostras identificadas como *S. aureus* e número de indivíduos portadores de *S. aureus*.

Grupo	Total de Indivíduos	Total de amostras coletadas	Amostras confirmadas <i>S. aureus</i>	Número de indivíduos portadores
Alunos	56	109	51	39 (69,6%)
Equipe Médica	61	120	35	29 (47,5%)
Técnicos	49	98	35	25 (51,0%)
Comunidade	68	136	13	12 (17,6%)
Paciente	35	48	45	32 (91,42%)

Nosso estudo revela que dentre todos os indivíduos submetidos à análise, descontando-se os pacientes, sabidamente infectados ou colonizados por *S. aureus*, 44,87% foram considerados como portadores assintomáticos, ou colonizados, e 55,13% como não portadores

Estudos realizados em diversos países revelam que, em relação aos portadores assintomáticos de *S. aureus*, as frequências observadas em equipes médicas é de 23,7% (revisado por Albrich, W. C. *et al.*, 2008) [66]. Nos trabalhos existentes sobre portadores de *S. aureus* entre membros da equipe médica no Brasil, foram relatadas frequências de portadores varia entre 33,3% e 84,7% [55, 90, 101, 102], o que coloca o HUB com valores dentro dos números reportados.

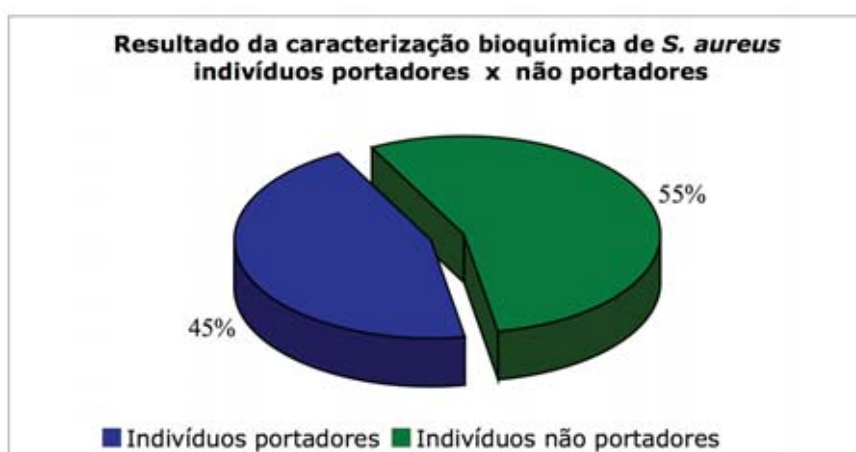


Gráfico 3. Frequência de portadores de *S. aureus* após a caracterização bioquímica. Valores referentes aos grupos Alunos, Equipe Médica, Técnicos e Comunidade. Somados, os grupos totalizam 234 indivíduos, dos quais 105 foram considerados portadores.

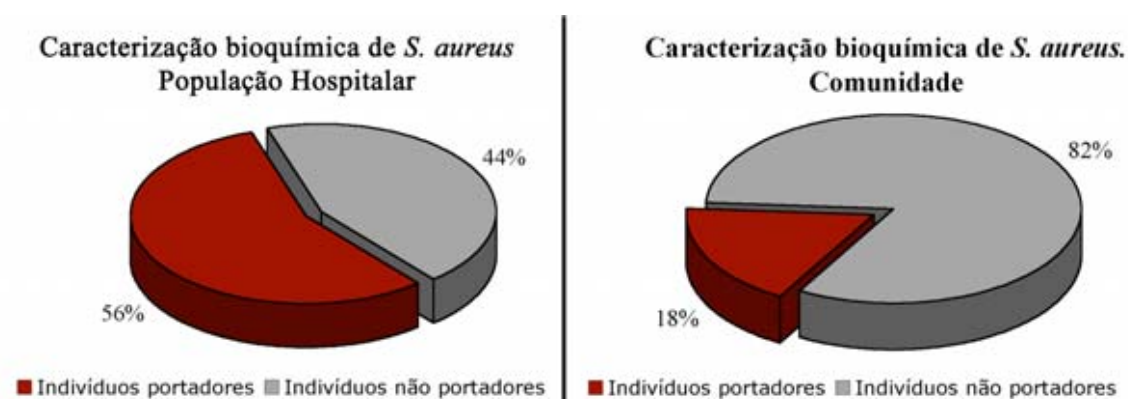


Gráfico 4. À esquerda frequência de portadores de *Staphylococcus aureus* nos grupos relacionados com o ambiente hospitalar (Alunos, Técnicos e Equipe Médica), e à direita frequência de portadores de *S. aureus* na comunidade.

Tendo em vista a potencial gravidade das infecções por *S. aureus*, especialmente aquelas provocadas por linhagens resistentes a vários agentes antimicrobianos de uso corrente no tratamento de tais quadros, consideramos também importante analisar o perfil de sensibilidade dos isolados caracterizados como *S. aureus* à oxacilina e à vancomicina. A escolha destas drogas baseou-se no crescente isolamento de linhagens MRSA (ou ORSA) e pelo fato de, nestes casos, a vancomicina corresponder à droga de escolha no tratamento de pacientes [21, 30, 46, 47, 62-76, 100, 103-111].

4.2.4 Análise do padrão de suscetibilidade à oxacilina e vancomicina

Os 179 isolados caracterizados microbiológica e bioquimicamente como pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* foram então submetidos ao teste de susceptibilidade à oxacilina (Gráfico 5) e à vancomicina, conforme descrito no item metodologia. Destes isolados totais, 45 eram provenientes do grupo Pacientes (controle positivo), sendo as demais subdivididas nos grupos de estudo, conforme apresentado a seguir: 51 de alunos, 35 da equipe médica, 35 de Técnicos e 13 da Comunidade.

Esta análise foi realizada empregando-se diluições seriadas das drogas, variando de 2 a 16 mg/l, com a finalidade de fornecer dados que permitissem a avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) das drogas para cada isolado analisado [68].

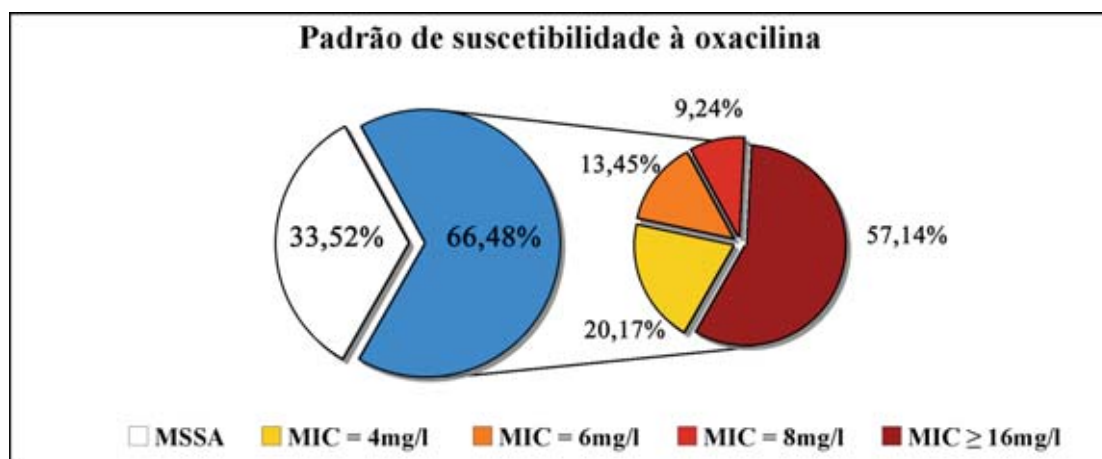


Gráfico 5: Perfil de susceptibilidade à oxacilina dos isolados identificados como *S. aureus*. Grupos: Alunos, Técnicos, Equipe Médica, Comunidade e Pacientes

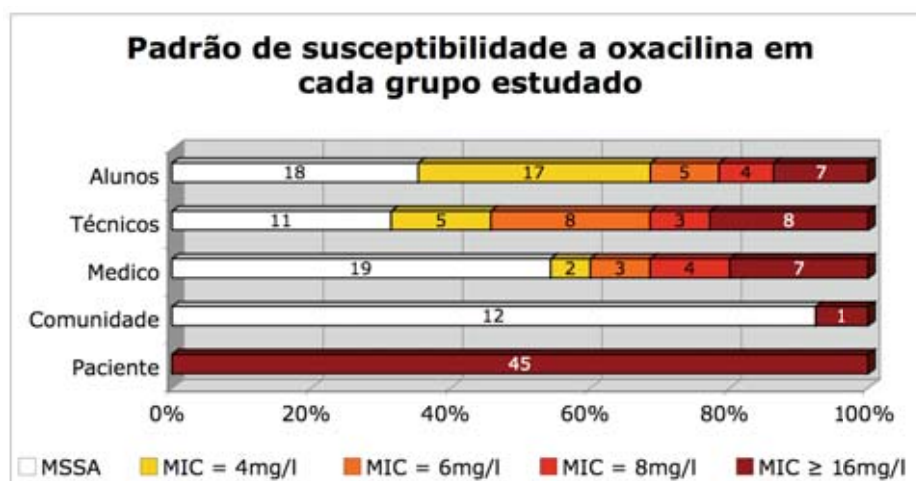


Gráfico 6: Perfil de susceptibilidade à oxacilina das amostras identificadas como *S. aureus* de cada grupo estudado..

De acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), cepas de *S. aureus* devem ser consideradas MRSA quando possuem um MIC maior ou igual a 4 mg/l, em teste empregando oxacilina [69].

Apenas 33,52% (60 de 179) dos isolados foram suscetíveis à droga e 66,48% (119 de 179) caracterizados como MRSA. Destes, 24 (20,17%) apresentaram MIC de 4mg/l; 16 (13,45%) MIC de 6mg/l; 11 (9,24%) MIC de 8mg/l e 68 (57,14%) MIC maior ou igual a 16mg/l (Gráfico 5).

Nenhum isolado apresentou crescimento nos ensaios empregando as mesmas concentrações de vancomicina.

Os genes que conferem resistência a múltiplos antibióticos ao *Staphylococcus aureus* estão presentes em um cassete cromossomal chamado *SCCmec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*), e de acordo com Hiramatsu *et al.* [68], a

incorporação do *SCCmec* ao cromossomo da célula é seguida de uma série de mutações que irão determinar o nível de resistência dessa cepa. Esse processo gera uma heterogeneidade criando sub-populações com diferentes padrões de suscetibilidade. Células que apresentam maior resistência à oxacilina podem não ser percebidos em testes de difusão de disco, por este impor à pressão seletiva de 2mg/l de oxacilina a um número reduzido de células [69-70]. Assim, o teste realizado nesse estudo produz um resultado mais preciso do perfil de resistência dos isolados caracterizados como *S. aureus*, que pode passar despercebido por outras metodologias.

4.3. Frequência de indivíduos portadores de *Staphylococcus aureus* susceptíveis (MSSA) e resistentes à oxacilina (MRSA), em relação à população total analisada.

Dos 269 indivíduos que participaram deste estudo, 35 correspondiam a pacientes internados no HUB, infectados por isolados de *S. aureus* previamente caracterizados como MRSA. As amostras destes pacientes foram submetidas aos testes de sensibilidade à oxacilina, uma vez que desconhecíamos seus valores de MIC. No entanto, para avaliarmos a frequência de indivíduos portadores de MSSA e MRSA, o grupo pacientes foi descartado, resultando assim em um número total de 234 indivíduos, separados nas seguintes categorias: Alunos - 56, Equipe Médica - 61, Técnicos - 49 e Comunidade - 68.

Deste total de 234 indivíduos, 129 não eram portadores, 41 portadores de MSSA e 64 de MRSA (Gráfico 7)



Gráfico 7: Frequência de indivíduos portadores de MRSA. Valores referentes aos grupos Alunos, Equipe Médica, Técnicos e comunidade.

A fim de verificarmos a existência de diferenças significativas na frequência de portadores de MSSA e MRSA em indivíduos vinculados ao hospital e aqueles da comunidade, os dados foram analisados separadamente, para os dois grupos. Os resultados revelam que há, de fato, uma importante diferença de portadores de MRSA na população hospitalar e na comunidade, uma vez que dentre os 166 indivíduos associados ao hospital (56 alunos, 61 equipe médica e 49 técnicos), 73 (43,98%) eram não portadores, 30 (18,07%) eram portadores de MSSA e 63 (37,95%) eram portadores de MRSA (Gráfico 8)



Gráfico 8: Frequência de indivíduos portadores de MRSA dos grupos com contato hospitalar: Alunos, Equipe Médica e Técnicos.

Por outro lado, dentre os 68 indivíduos da comunidade 56 eram não portadores, 11 eram portadores de MSSA e 1 era portador de MRSA (Gráfico 9), indicando



Gráfico 9: Frequência de indivíduos portadores de MRSA no grupo Comunidade.

claramente uma diferença significativa na frequência de portadores de MRSA

nas duas populações.

O isolamento de MRSA em funcionários é comum em vários hospitais no mundo, mas uma frequência de 38% corresponde a um valor bastante elevado, tendo em vista que a média internacional é de 5,4 % (revisado por Albrich, W. C. *et al.*, 2008) [66]. Embora outros trabalhos relatem frequências de portadores de MRSA variando de 0% a 59%, a média internacional em hospitais onde MRSA é considerado endêmico é de 8,1%, tendendo a ser mais alta em países do sul da Europa [46, 47] e em países em desenvolvimento [66]. No Brasil outros estudos relataram frequências de portadores de MRSA de até 20% [55, 90, 101, 102].

A maioria dos estudos relacionados a funcionários sem sintomas de infecção abordam apenas uma classe profissional, normalmente médicos e enfermeiros que lidam diretamente com pacientes acometidos de infecção por este agente [21, 65, 66, 69, 71, 73, 74, 102, 112,]. Assim, a comparação entre os resultados desta pesquisa e estudos prévios é possível apenas entre os grupos individualmente (Tabela 9 e apêndice D).

No grupo Alunos foram identificados 39 portadores de *S. aureus*, sendo 30 (76,92%) portadores MRSA e 9 (23,08%) de MSSA. No grupo Técnicos foram identificados 25 portadores de *S. aureus*, sendo 19 (76,0%) portadores de MRSA e 6 (24,0%) de MSSA. No grupo Equipe Médica, foram identificados 29 portadores de *S. aureus*, sendo 14 (48,28%) portadores de MRSA e 15 (51,72%) de MSSA. No grupo Comunidade foram identificados 12 portadores de *S. aureus*, sendo 1 (8,33%) portador de MRSA e 11 (91,67%) de MSSA.

Tabela 9. Números e proporções dos resultados encontrados por Grupo de Estudo e no grupo Comunidade.

Grupo	Nº	Portadores de <i>S. aureus</i>	MRSA (%)
Alunos	56	39 (69,64%)	30 (76,92%)
Técnicos	49	25 (51,02%)	19 (76,0%)
Equipe Médica	61	29 (47,54%)	14 (48,28%)
Comunidade	68	12 (17,64%)	01 (8,33%)
Total	234	105 (44,87%)	64 (27,35%)

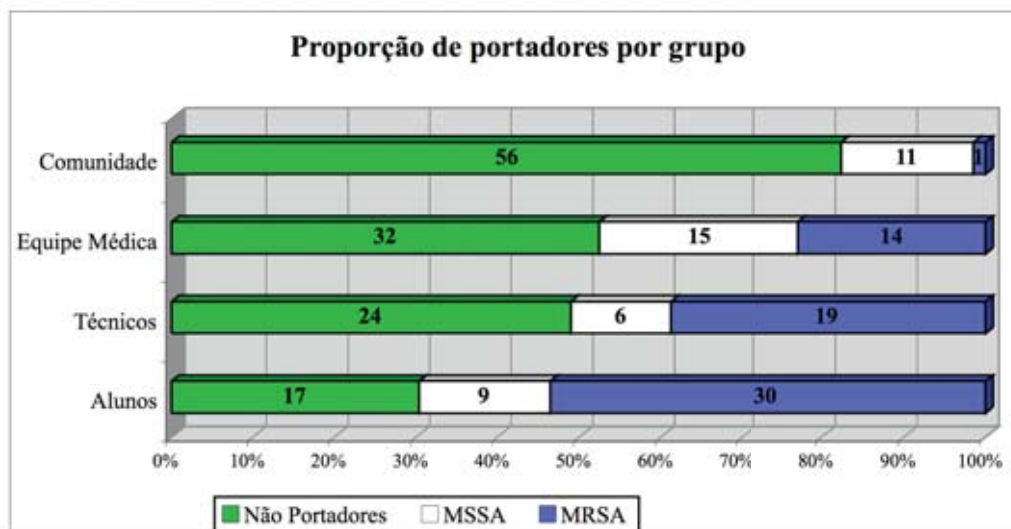


Gráfico 10: Representação por proporção de cada grupo estudado. Cada barra representa 100% das amostras do respectivo grupo. Os valores impressos nas barras representam os valores absolutos do número de indivíduos não portadores, portadores de *S. aureus* sem resistência à oxacilina (MSSA) e portadores de *S. aureus* resistentes à oxacilina (MRSA).

O grupo Comunidade foi incluído no estudo a fim de podermos comparar os resultados obtidos na população hospitalar com uma população sem qualquer vínculo com ambientes hospitalares. No entanto, nosso grupo Comunidade não deve ser considerado como representativo da comunidade do Distrito Federal. Entre os fatores que levam a essa limitação estão os locais de coleta, que consistiram em salas de aulas de curso preparatórios, ou seja, recintos confinados, caracterizados pelo grande trânsito de indivíduos que interagem diariamente, e a amostragem, que foi pequena frente ao número de habitantes da região. Contudo os valores são próximos aos de estudos realizados em outros países [66, 71, 74].

Na Tailândia, por exemplo, um estudo com 1838 indivíduos da comunidade relatou uma frequência de portadores de *S. aureus* de 25,2% e uma frequência de portadores de MRSA de 3,5% [71]. Outros estudos em diversos países reportam frequências similares [66]. No Brasil, estudos mostram frequências de até 37% de portadores de *S. aureus*, e 3% de MRSA [72, 112].

4.4 Discussão e Relevância dos Resultados Obtidos na População Hospitalar

Além de relatar a frequência de indivíduos portadores de *S. aureus* MSSA e MRSA dentre os funcionários e alunos que frequentam regularmente o HUB, os resultados obtidos neste estudo permitem discutir alguns aspectos de grande

relevância em relação às medidas de prevenção e controle de infecções hospitalares por *S. aureus*, bem como às possíveis medidas a serem adotadas no sentido de minimizar o grau de colonização dos profissionais e alunos que frequentam o Hospital Universitário.

Assim, passaremos a discutir alguns dos resultados obtidos nos diferentes grupos estudados, abordando também as diferenças observadas nas sub-populações que constituíam cada um dos grupos.

A frequência de portadores de *S. aureus* entre os grupos Equipe Médica e Técnicos foi de 47,54% e 51,02%, respectivamente, o que não representa uma diferença significativa ($P = 0,717$). No entanto, a proporção de portadores de MRSA e MSSA nestas duas categorias diferiu consideravelmente ($P = 0,037$) (Gráfico 10). Dentre os isolados identificados como *S. aureus* na Equipe Médica, 48,28% foram caracterizados como MRSA e 51,72% como MSSA, enquanto no grupo Técnicos, 76% foram caracterizados como MRSA e 24% como MSSA. Essa diferença pode ser explicada com base em diversos fatores. Inicialmente, a menor frequência de MRSA nos indivíduos do grupo Equipe Médica provavelmente é decorrente das práticas de higienização adotadas rotineiramente pelos indivíduos que estabelecem contatos próximos com pacientes. Por outro lado, a alta frequência de MRSA observada nos indivíduos do grupo Técnicos sugere que tal população possa estar sujeita a uma exposição a objetos e materiais contaminados, uma vez que neste estudo, tais indivíduos não mantinham contato direto com pacientes. Desta forma, o ambiente pode atuar como fonte de contaminação. Além disso, é possível que os indivíduos do grupo Técnico não realizem com frequência as práticas de higienização correntemente adotadas pelo grupo Equipe Médica.

Na Alemanha, por exemplo, ao encontrar portadores de MRSA entre funcionários de um hospital, a administração iniciou um trabalho de descolonização do pessoal. Nesse processo, foram isoladas cepas geneticamente relacionadas a partir de diversos objetos inanimados pertencentes a esses profissionais, como armários do próprio hospital, além de roupas, interruptores de luz, televisões, sofás e diversos utensílios domésticos, sugerindo assim, a importância do ambiente físico como reservatório, permitindo que esses indivíduos atuassem como disseminadores de linhagens de *S. aureus* [21].

Tabela 10. Proporção do tipo de colonização por MRSA nos grupos de estudo

Grupo	Total	Nasal	Sub-ungueal	Ambos
Alunos	30	12 (40,0%)	13 (43,3%)	5 (16,6%)
Equipe Médica	14	9 (64,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)
Técnicos	19	9 (47,4%)	5 (26,3%)	5 (26,3%)
Total	63	30 (46,9%)	21 (32,8%)	13 (20,3%)

Dentre os portadores de MRSA no grupo Técnicos, 73,68% (14 de 19) apresentaram amostras positivas isoladas do nariz, sendo 9 de portadores exclusivamente nasais e 5 amostras de portadores nasais e sub-ungueais (Gráfico 11 e Tabela 10 e apêndice D). O sítio corpóreo do qual foi isolada a amostra de MRSA pode também indicar o possível estado de colonização do indivíduo. Estudos relacionados à descolonização de funcionários relataram grande dificuldade em se erradicar uma colonização nasal, enquanto a descolonização sub-ungueal se mostrou relativamente simples [21, 77]. Esses dados sugerem que existe uma maior possibilidade de a colonização sub-ungueal ser transitória, enquanto a colonização nasal apresenta uma característica mais estável.

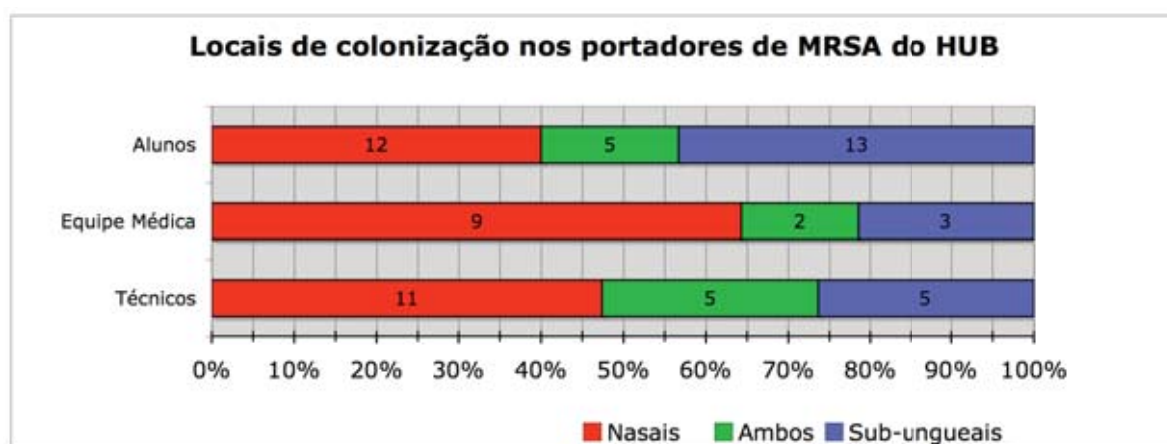


Gráfico 11: Representação da proporção do tipo de colonização por MRSA nos grupos de estudo. Cada barra representa 100% das amostras do respectivo grupo. Os valores impressos nas barras representam os números absolutos de indivíduos colonizados apenas no nariz (vermelho), em ambos os locais (Azul) e apenas nas unhas (verde).

Não é possível determinar se os funcionários envolvidos neste estudo são portadores transitórios ou estáveis, visto que apenas uma amostra foi coletada dos sítios de cada indivíduo. Contudo, uma possível exposição a objetos e materiais contaminados, sugerida pela alta frequência de portadores de MRSA neste grupo, pode estar contribuindo para uma colonização mais estável, evidenciada pela frequência de portadores nasais.

Ao mesmo tempo que a colonização nasal pode corresponder a um potencial reservatório desses microorganismos, a colonização sub-ungueal pode desempenhar papel crucial na disseminação de cepas epidêmicas [21, 31, 46, 47, 77]. Com 52,63% (10 de 19) de amostras sub-ungueais positivas entre os portadores de MRSA do grupo Técnicos, sendo 5 portadores exclusivamente sub-ungueais e 5 em ambos os locais (Gráfico 11 e Tabela 10), pode-se questionar se tais indivíduos teriam papel na disseminação de MRSA no hospital. Alguns desses funcionários podem estabelecer contatos indiretos com os pacientes, seja pela manipulação das vestimentas e roupas de cama dos pacientes ou pela higienização do hospital (Gráfico 12). Como o grupo Técnicos é um grupo heterogêneo no que diz respeito a atividade dos seus constituintes, é importante verificar se os indivíduos dos diferentes setores de trabalho contribuíram de maneira uniforme ao resultado obtido, e com isso identificar as atividades de maior risco de disseminação dessas cepas. Essa análise foi realizada e os resultados obtidos são apresentados item 4.5.2 deste trabalho.

Apesar do grupo Equipe Médica ser o grupo com a menor frequência de portadores de MRSA, os números encontrados são alarmantes. Alguns autores afirmam que a maioria dos casos de infecção hospitalar é decorrente de microrganismos pertencentes à microbiota natural do paciente, onde determinados grupos teriam maior oportunidade de crescer, quando o indivíduo encontra-se imunocomprometido [22, 113, 114]. Entretanto, inúmeros artigos indicam o importante papel dos microrganismos exógenos como causadores de infecções hospitalares [21, 62-65, 67-77]. A maneira como esses microrganismos se disseminam pelo hospital, ou até mesmo para outros hospitais, ainda não está totalmente elucidada [75], porém os profissionais da equipe médica estão entre os suspeitos apontados como possíveis agentes não só dessa disseminação, como também da transmissão para os pacientes [21, 66, 75-77].

De acordo com um estudo que tabulou dados relativos a frequências de

portadores em nível mundial, a média internacional de portadores de MRSA em profissionais que estabelecem contato direto com o paciente é de 5,3% [66]. No entanto, estes números diferem significativamente de uma instituição para outra, com relatos apontando desde hospitais sem qualquer portador, até instituições onde 50% da equipe encontra-se colonizada [66]. Em um estudo realizado na Santa Casa de Ponta Grossa, no Paraná, entre 1996 e 2000, a frequência de portadores de MRSA dentre os membros da equipe médica foi em média de 5,7% contra 26,6% de MSSA [102]. Em contraste, neste estudo foram registrados 48,28% (14 de 29) portadores de MRSA e 51,72% portadores de MSSA dentre os indivíduos que pertenciam ao grupo Equipe Médica (Gráfico 10)

Entre os portadores de MRSA na Equipe Médica, 78,57% (11 de 14) tiveram amostras positivas isoladas do nariz, sendo que 2 indivíduos apresentaram também colonização sub-ungueal. Apenas 3 indivíduos apresentaram MRSA exclusivamente nas unhas.

O intenso contato desses profissionais com indivíduos infectados e possíveis reservatórios de MRSA poderia sugerir uma elevada frequência de portadores sub-ungueais. No entanto, apenas 3 indivíduos apresentaram isolados positivos para este sítio. Tal resultado pode ser reflexo da higienização das mãos, habitualmente realizada por esses profissionais. No caso da colonização nasal, esta torna-se mais preocupante em virtude da maior dificuldade de sua erradicação.

Apesar de poucos trabalhos analisarem a frequência de indivíduos portadores dentre alunos das diferentes áreas da saúde, seu possível papel na disseminação de MRSA já foi discutido a partir da identificação, em alunos de um curso de enfermagem, clones relacionados a um surto [65]. Em um estudo na Índia, 88% dos alunos de um hospital universitário portavam *S. aureus*, sendo identificadas linhagens de MRSA em 24%, e MSSA em 64% dos indivíduos [73]. No presente estudo, a frequência de portadores de *S. aureus* foi de 69,64% no grupo Alunos, sendo que destes portadores, 76,92% apresentavam linhagens de MRSA (Gráfico 10 e Tabela 9).

O grupo Alunos foi o grupo com a maior frequência de portadores de MRSA, atingindo um valor próximo ao mais altos reportados na literatura, de acordo com a revisão de Albric *et al.* (2008) [66]. Os indivíduos que integraram esse grupo realizavam atividades no hospital, porém seu contato com pacientes não era tão intenso como aquele de profissionais formados, e tais indivíduos não estabeleciam contato com os objetos e materiais como os indivíduos do grupo Técnicos.

Entre os portadores de MRSA no grupo Alunos, 56,67% (17 de 30) tiveram amostras positivas isoladas do nariz, sendo 12 amostras de portadores exclusivamente nasais e cinco amostras de portadores nasais e sub-ungueais. Treze (43,33%) indivíduos foram classificados como portadores exclusivamente sub-ungueais (Gráfico 11). Este foi o grupo com o maior número de portadores sub-ungueais, sendo encontradas linhagens MRSA nas unhas de 60% dos portadores do grupo (13 sub-ungueais e 5 nasais e sub-ungueais, Gráfico 11). Ao comparar esses números com aqueles encontrados no grupo Comunidade (em relação a portadores de MSSA) é levantada a questão sobre a origem da colonização sub-ungueal. Apenas um indivíduo possuía MSSA nas unhas, e este era também portador nasal. Este dado reforça o argumento de que a colonização sub-ungueal tende a ser transitória, visto que indivíduos da comunidade possuem pouco contato com possíveis fontes de contaminação. Neste caso, o estado de portador sub-ungueal dos indivíduos do grupo Alunos poderia estar ligado à exposição a fatores de risco, associado a um possível descuido em relação a procedimentos preventivos.

Por negligência, desconhecimento, ou simplesmente falta de hábito, os alunos podem não estar cumprindo a rotina de higienização adequadamente, o que explicaria, em parte, a grande diferença entre o número de portadores de MRSA neste grupo em comparação à Equipe Médica e a semelhança proporcional com Técnicos, que, teoricamente, não executam uma rotina de higiene pessoal tão rígida.

A questão do papel dos alunos na disseminação de MRSA abordada pelo estudo francês [65] é levantada neste trabalho. A alta frequência de portadores de MRSA, principalmente de portadores sub-ungueais, ligada ao acesso e contato com os pacientes pode levar os indivíduos deste grupo a atuarem como vetores diretos ou indiretos de MRSA. Contudo não existem dados suficientes na literatura, e também neste trabalho, que permitam afirmar se essa relação é verdadeira, sendo necessárias investigações mais profundas e direcionadas a fim de confirmar tal hipótese.

Após essa análise preliminar, cada grupo de estudo foi subdividido e analisado individualmente, sendo os resultados apresentados abaixo.

4.5 Análise do perfil dos portadores dos Grupos de Estudo

Para permitir uma análise mais detalhada dos resultados obtidos em cada categoria, os grupos de estudo foram subdivididos de acordo com a profissão (Equipe Médica), setor de trabalho (Técnicos) ou curso de formação (Alunos) (Gráfico 12). Como nosso principal enfoque referia-se aos portadores assintomáticos no ambiente do HUB, os grupos Comunidade e Pacientes não foram subdivididos.

O grupo Alunos foi dividido em alunos de medicina, alunos de enfermagem e alunos de odontologia. O grupo Equipe Médica foi dividido em técnicos e auxiliares de enfermagem; enfermeiros e médicos. O grupo Técnicos foi dividido em administração, cozinha, higienização, lavanderia e serviços gerais. O número de amostras coletadas em cada categoria é apresentado no Gráfico 12.

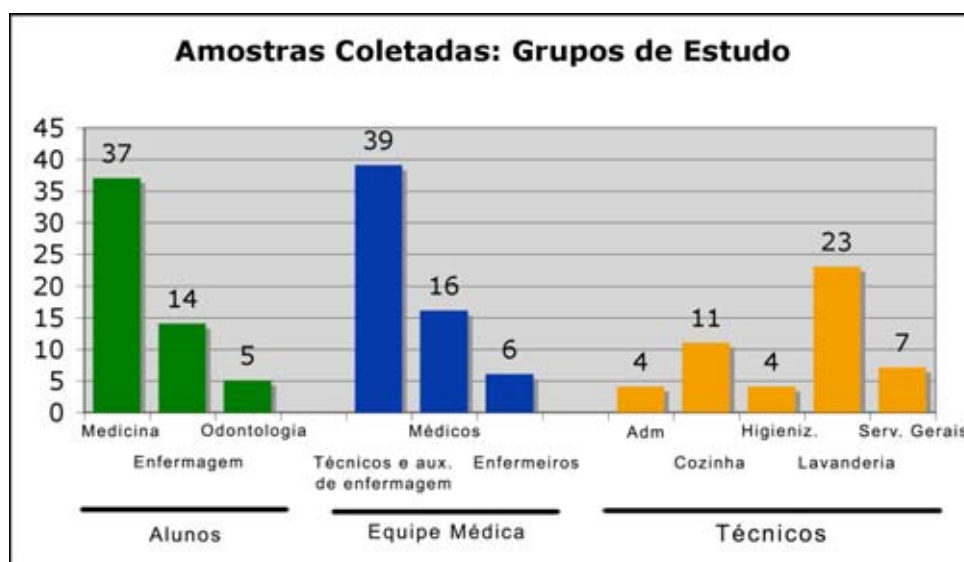


Gráfico 12: Número de amostras coletadas por categoria de cada grupo de estudo.

4.5.1. Alunos

Alunos de três cursos participaram do estudo: medicina, enfermagem e odontologia (Tabela 11 e apêndice D). Entre os alunos do curso de medicina, 72,97% (27 de 37) foram caracterizados como portadores de *S. aureus*, sendo que 21 (56,76%) possuíam MRSA, seis (16,21%) possuíam MSSA e dez (27,02%) eram não portadores. Entre os alunos do curso de enfermagem, 71,42% (10 de 14) foram caracterizados como portadores de *S. aureus* sendo sete (50,0%) portadores de MRSA, três (21,42%) portadores de MSSA e quatro (28,57%) não portadores. Entre

os alunos de odontologia, 40,0% (2 de 5) foram caracterizados como portadores de MRSA, e três (60%) como não portadores (Tabela 11 e Gráfico 13).

Tabela 11. Resultados encontrados por curso no grupo Alunos.

Curso	Total de indivíduos	Portadores de <i>S. aureus</i>	Portadores de MRSA
Medicina	37	27 (72,97%)	21 (56,76%)
Enfermagem	14	10 (71,41%)	7 (50,0%)
Odontologia	5	2 (40,0%)	2 (40,0%)

Os alunos dos cursos de medicina e enfermagem possuem proporções de portadores de MRSA semelhantes ($P = 0,665$), o que era esperado visto que o acesso desses alunos ao hospital e o contato com os pacientes, médicos, enfermeiros e com o ambiente é semelhante.

Poucos estudos foram realizados com o objetivo de analisar os estudantes de medicina ou enfermagem durante o curso de formação, o que dificulta a comparação com os dados obtidos. Pesquisas publicadas na Irlanda, Nigéria e Austrália demonstraram, em média, uma frequência de 30% de portadores de *S. aureus* [115]. Esse valor não se alterou com o aumento da exposição do aluno ao hospital, mas o grau de resistência das bactérias sim. Quanto mais exposto ao hospital, maior a tendência do aluno ser portador de uma cepa multi-resistente [115]. Neste estudo, 56,76% dos estudantes de medicina foram caracterizados como portadores de MRSA.

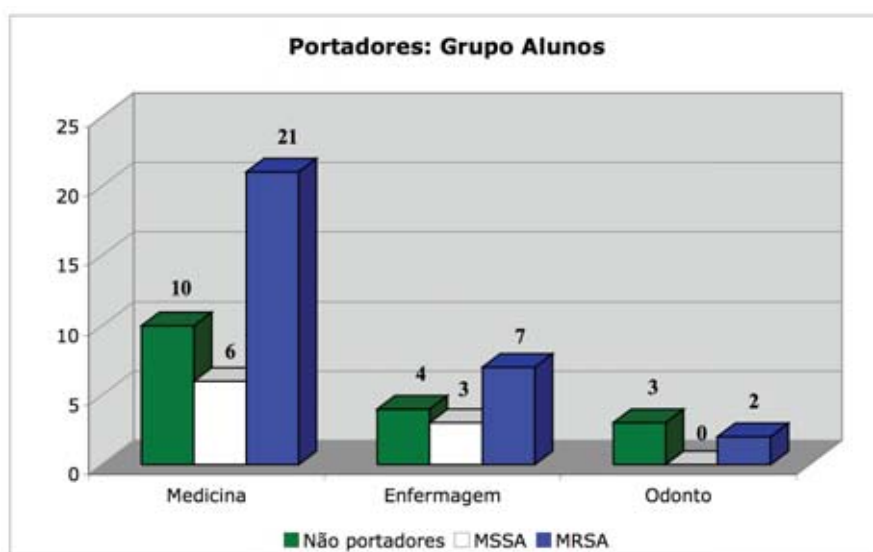


Gráfico 13: Caracterização das amostras de alunos divididos por curso de formação.

Em Ribeirão Preto, na Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, um estudo apontou 88,1% de portadores de *S. aureus* entre 42 alunos do curso de auxiliar de enfermagem [116]. Infelizmente, não foi realizada uma análise sobre o perfil de resistência desses isolados. Mesmo não sendo o ideal para uma comparação, esse estudo em São Paulo demonstra que a alta frequência de portadores de *S. aureus* entre alunos da área de saúde pode ser uma realidade em alguns hospitais do Brasil.

A baixa representatividade dos alunos de odontologia impede inferir sobre sua contribuição ao resultado final.

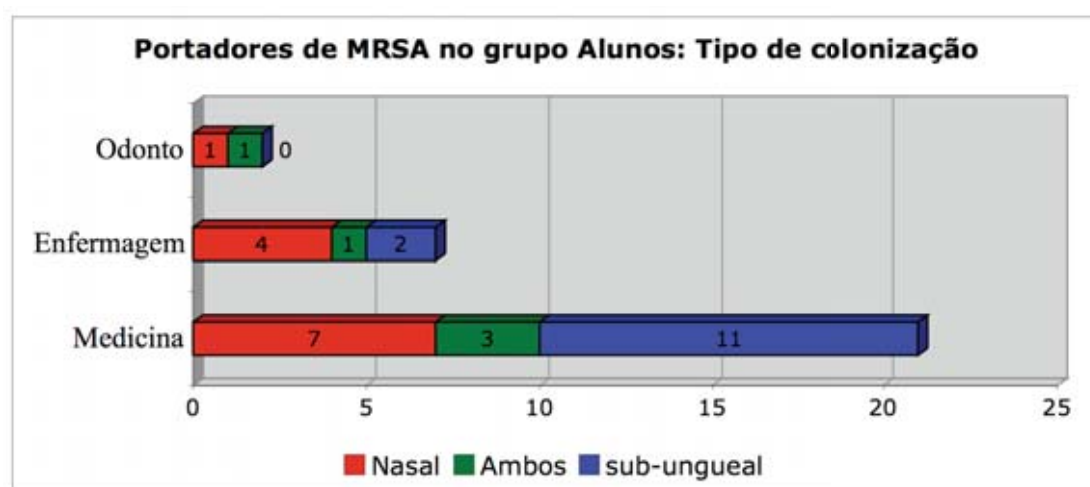


Gráfico 14. Número de portadores de MRSA que tiveram a caracterização nas amostras nasais e sub-ungueais

Um dado que é digno de nota refere-se ao grande número de alunos que apresentaram MRSA nas amostras coletadas das unhas (Gráfico 14). Entre os alunos de medicina, 52% (11 de 21) tiveram MRSA isolado da unha, 33% (7 de 21) isolado do nariz e 14% (3 de 21) tiveram MRSA isolado em ambos os locais. Entre os alunos de enfermagem, 29% (2 de 7) tiveram MRSA isolado da unha, 36% (4 de 7) isolado do nariz e 14% (1 de 7) tiveram MRSA isolado em ambos os locais. Entre os alunos de odontologia, 50% (1 de 2) tiveram MRSA isolado da unha, e 50% (1 de 2) tiveram MRSA isolado em ambos os locais (Gráfico 14).

Tanto a proporção de portadores de MRSA entre alunos de medicina e de enfermagem é semelhante, como a proporção de portadores nasais e sub-ungueais.

Esse fato é curioso, pois um aluno de enfermagem ou medicina está ciente do perigo de contaminação pessoal e ao paciente. Poderíamos esperar que os alunos

apresentassem um padrão de colonização semelhante ao do grupo Equipe Médica (Gráfico 11), com uma menor probabilidade de exibir colonização das mãos, quando comparado ao nariz, visto que a rotina de assepsia deveria eliminar tais microorganismos das regiões sub-ungueais.

4.5.2. Técnicos

Das cinco divisões do grupo Técnicos, três compreendem um pequeno número de amostras: Administração e Higienização, com quatro cada, e Serviços Gerais, com sete. O número de portadores de MRSA desses subgrupos são: Administração e Higienização com três e dois (75,0% e 50,0%), respectivamente, sendo que todos apresentaram resistência à oxacilina, e Serviços Gerais, onde foram identificados três portadores de *S. aureus*, sendo que apenas um apresentou resistência (Tabela 12, Gráfico 15 e apêndice D).

Os outros dois grupos são Cozinha, com 11 indivíduos e Lavanderia com 23. Na cozinha foi encontrado apenas um (9,1%) portador de *S. aureus*, que foi caracterizado como MRSA. Já na lavanderia, 16 (69,6%) indivíduos foram considerados portadores de *S. aureus*, sendo que 12 (52,2%) foram caracterizados como MRSA (Tabela 12 e Gráfico 15).

Tabela 12. Resultado final do grupo Técnicos.

Setor	Total de indivíduos	Portadores de <i>S. aureus</i>	MRSA
Administração	4	3 (75,00%)	3 (75,00%)
Cozinha	11	1 (9,09%)	1 (9,09%)
Higienização	4	2 (50,00%)	2 (50,00%)
Lavanderia	23	16 (69,56%)	12 (52,17%)
Serviços Gerais	7	3 (42,85%)	1 (14,28%)

Os setores Cozinha e Lavanderia apresentam um grande contraste quanto ao número de portadores de *S. aureus* e de MRSA ($P = 0,016$). Era esperado um baixo número de amostras positivas na cozinha, porém o resultado obtido na lavanderia foi uma surpresa. É provável que o pequeno número de portadores entre os funcionários da cozinha seja devido ao rigoroso controle de higiene a que são submetidos. São obrigatórios, por exemplo, a lavagem criteriosa das mãos sempre que entrar e sair do setor e o uso de toucas descartáveis dentro do ambiente da cozinha. Provavelmente, critérios tão rigorosos não sejam executados na lavanderia, ou, outra possível

explicação seria o fato dos funcionários da lavanderia estabelecerem contato regular com materiais possivelmente contaminados. Funcionários da lavanderia diariamente manuseiam roupas de cama e vestimentas de pacientes e funcionários, eventualmente contaminados.

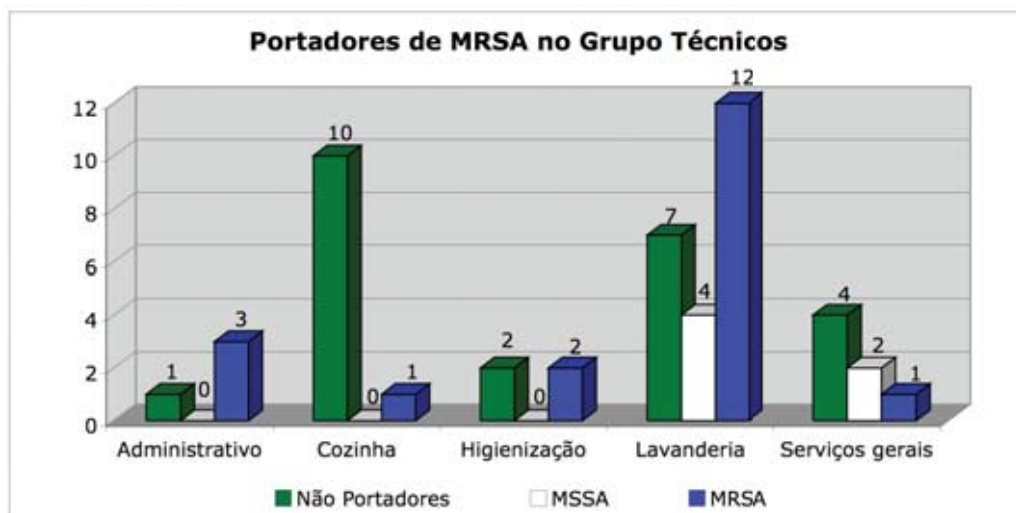


Gráfico 15. Classificação do grupo Técnicos, por setor de atividade

Devido ao número de amostras coletadas de funcionários da cozinha do HUB, o resultado final da frequência de portadores do grupo Técnicos pode ter sido mascarada. Ao se eliminar as amostras desse setor, a frequência de portadores de MRSA sobe de 38,8% para 47,4%, ficando próxima da frequência observada no grupo Alunos (53,6%). Não existe qualquer evidência de que esses número possam estar relacionados a um fator comum entre esses dois grupos, mas levanta a questão da exposição *versus* higiene. A importância de cada um destes fatores para que dois grupos tão distintos tivessem uma frequência de colonização similar e, ao mesmo tempo, tão diferentes de outros setores do hospital, tais como cozinha e equipe médica, poderá ser respondida através de um estudo direcionado a essas duas categorias.

Ao comparar os portadores quanto à origem da amostra, é interessante verificar que apenas o grupo Lavanderia apresenta indivíduos portadores de MRSA em ambos os locais de coleta, nariz e unha, além do alto número de portadores exclusivamente sub-ungueais (Gráfico 16).

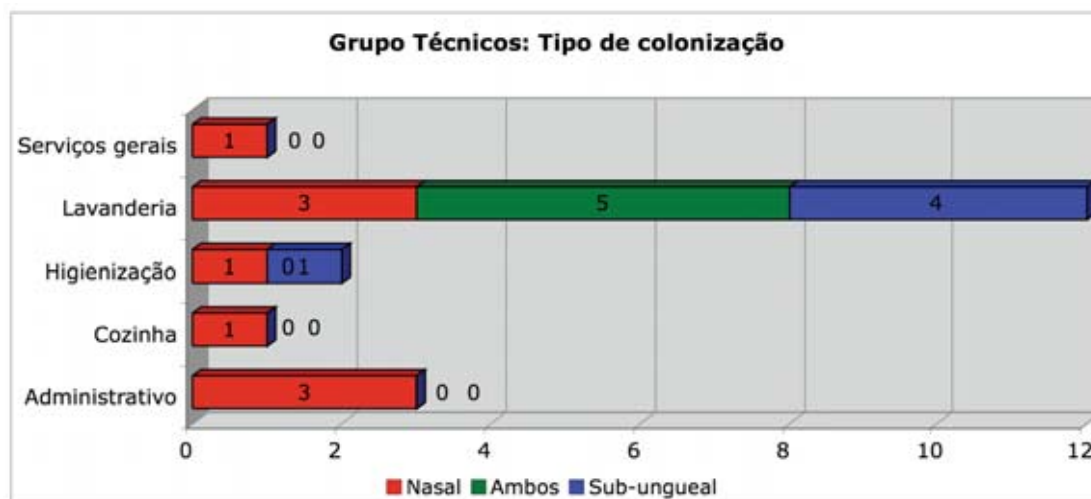


Gráfico 16. Tipo de colonização do grupo Técnicos subdividido por setor de trabalho. Dados referentes a portadores de MRSA.

As amostras oriundas dos sub-grupos administrativo, cozinha e serviços gerais apresentaram colonização exclusivamente nasal. Dos dois funcionários do sub-grupo higienização portadores de MRSA, um possuía colonização nasal e o outro colonização sub-ungueal. Na lavanderia, três funcionários apresentaram colonização nasal, quatro sub-ungueal, e cinco funcionários em ambos os locais de coleta (Gráfico 16).

Indivíduos que não possuem contato provável com pacientes ou materiais possivelmente colonizados, como funcionários da área administrativa e cozinha, apresentaram colonização nasal, fato que, aliado ao isolamento de MRSA em todas as categorias estudadas, pode ser um indício do endemismo dessa bactéria no hospital [66].

Apesar de não manter contato direto com o paciente, os indivíduos do grupo Técnicos podem desempenhar um papel importante na disseminação de cepas endêmicas e até na colonização de pacientes. Seja ao manipular objetos que serão utilizados por membros da equipe médica ou até mesmo pelo próprio paciente, ou na manutenção do hospital, portadores transientes ou permanentes neste grupo podem estar transportando essas bactérias para diversas alas do hospital.

A colonização sub-ungueal pode estar relacionada a uma higienização inadequada das mãos, seguida de um contato recente a uma fonte de contaminação. Esse tipo de contaminação, foi controlado em outros hospitais apenas com uma campanha de lavagem das mãos, seguida de um acompanhamento semanal dos funcionários identificados como portadores [21].

Já a colonização nasal, só pôde ser controlada nesses mesmos hospitais com antibióticos de uso tópico à base de mupirocina, seguida de descolonização de possíveis reservatórios de cada indivíduo e acompanhamento semanal. Na maioria dos casos a descolonização leva vários meses, e após algumas semanas seguidas com amostras negativas podem voltar a apresentar uma amostra positiva geneticamente relacionada com as cepas anteriores [21].

A inclusão desse grupo teve como objetivo abordar o maior número de setores e profissionais do HUB, no intuito de traçar um perfil da colonização. O número de amostras em alguns subgrupos não foi grande o suficiente para serem analisadas estatisticamente. Entretanto, a amostragem cumpriu com o objetivo proposto visto que, a partir dos resultados obtidos, é possível inferir quais setores do hospital talvez necessitem incrementar políticas e descolonização e acompanhamento do pessoal envolvido nas diversas atividades.

4.5.3 Equipe médica

Entre os funcionários de nível técnico, 51,3% (20 de 39) foram caracterizados como portadores de *S. aureus*, sendo que dez (25,6%) possuíam MRSA, dez (25,6%) possuíam MSSA e em 19 (48,7%) não foi identificado *S. aureus*. Entre os médicos, 31,2% (5 de 16) foram caracterizados como portadores de *S. aureus*, sendo que três (18,8%) possuíam MRSA, dois (12,5%) possuíam MSSA e em 11 (68,8%) não foi identificado *S. aureus*. Entre os enfermeiros, 66,7% (4 de 6) foram caracterizados como portadores de *S. aureus* sendo que um (16,7%) possuía MRSA, três (50,0%) possuíam MSSA e em 2 (33,3%) não foi identificado *S. aureus*. (Tabela 13 e Gráfico 17).

Tabela 13. Resultado do grupo Equipe Médica. Um total 61 de indivíduos participaram da pesquisa, sendo 14 (23%) portadores de MRSA.

Profissão	Total de indivíduos	Portadores de <i>S. aureus</i>	MRSA
Aux. e Téc. enferm.	39	20 (51,3%)	10 (25,6%)
Médicos	16	5 (31,2%)	3 (18,8%)
Enfermeiros	6	4 (66,7%)	1 (16,7%)

Técnicos e auxiliares de enfermagem comparados aos médicos não possuem diferença estatisticamente significativa entre a frequência de portadores de *S. aureus* ($P = 0,175$) e MRSA ($P = 0,585$). O número de amostras de enfermeiros não foi

suficiente para realizar comparações estatísticas.

Quanto à frequência de portadores de MRSA nasais e sub-ungueais, 70% (7 de 10) dos técnicos e auxiliares de enfermagem tiveram isolados provenientes do nariz e 30% (3 de 10) das unhas. Nenhum apresentou MRSA em ambas as regiões. Entre os médicos, dois indivíduos (67%) possuíam MRSA tanto no nariz quanto na unha, um (33%) possuía apenas no nariz e nenhum possuía MRSA apenas nas unhas. Entre os enfermeiros, a única amostra caracterizada como MRSA foi coletada de nariz (Gráfico 18).

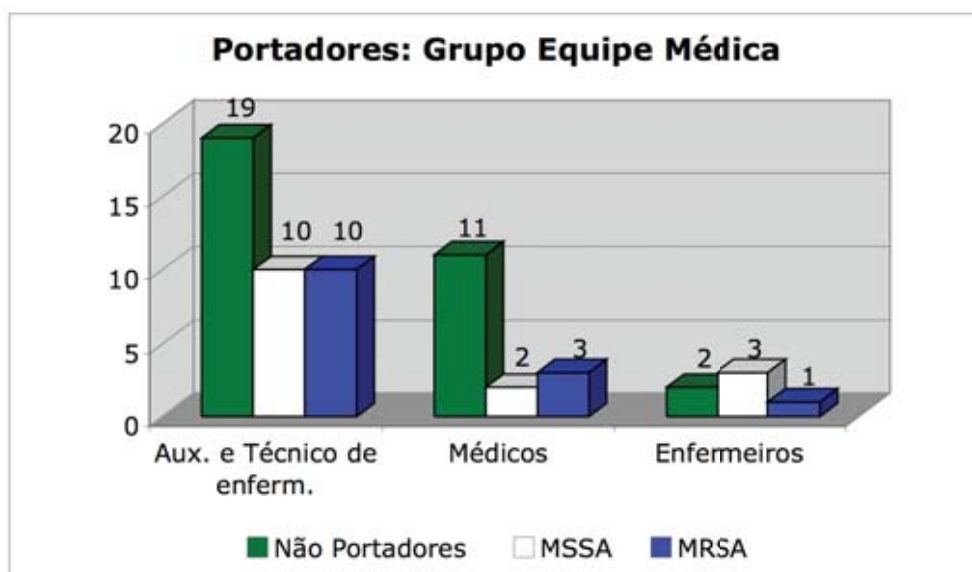


Gráfico 17. Proporção de portadores entre os profissionais do Grupo Equipe Médica.

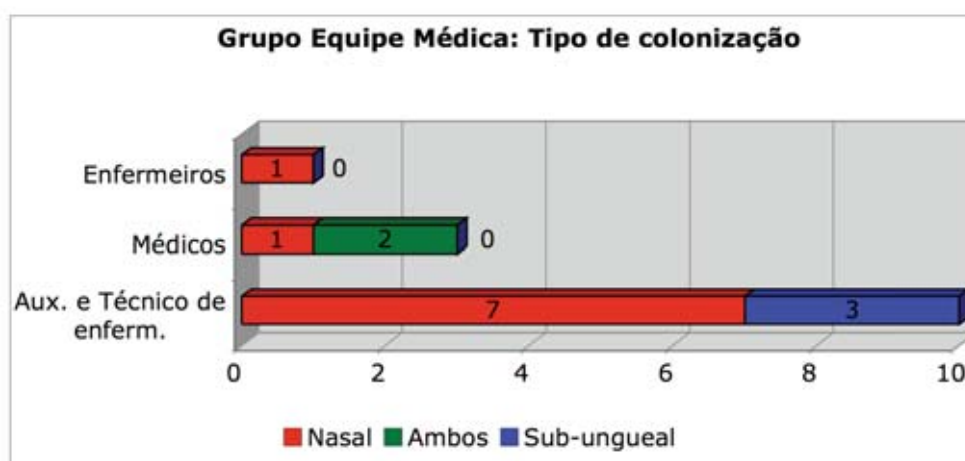


Gráfico 18. Tipo de colonização do grupo Equipe médica subdividida por profissional.

Apesar de não ter sido encontrado entre os médicos portadores de MRSA exclusivamente sub-ungueais, dois indivíduos possuíam colonização tanto nas mãos quanto no nariz. Dividindo esses casos em portadores nasais e sub-ungueais, a nova proporção seria de 60% (3 de 5) portadores nasais para 40% (2 de 5) portadores sub-ungueais. Comparando estes números com os dos profissionais de nível técnico, 70% de portadores nasais e 30% sub-ungueais, conclui-se que o tipo de colonização entre esses profissionais é semelhante. Ambos os profissionais estão expostos às mesmas condições e riscos de contaminação, mesmo com a duração e tipo de contato distintos com os pacientes.

Embora não seja possível determinar se a equipe médica desempenha algum papel na disseminação de MRSA ou na contaminação de pacientes, ou se estes profissionais estão sendo contaminados pelos pacientes ou pelo ambiente hospitalar, a descolonização de funcionários é recomendada em protocolos internacionais de controle de infecção nosocomial [21, 117]. Apesar de vários administradores questionarem a eficácia desse procedimento frente ao custo operacional [75], é evidente a queda no número de infecções por MRSA nos hospitais que executaram a descontaminação criteriosa [21, 30, 76, 104, 105]. De fato, as instituições que adotaram tais medidas de maneira enfática tiveram uma redução significativa nas infecções por MRSA [21, 30, 76, 104, 105], alcançando uma frequência de descolonização em torno de 85% [21, 66].

4.5.5 Comunidade

Na comunidade, foram encontrados 12 (17,6%) indivíduos portadores de *S. aureus* sendo que 16,2% (11 de 68) possuíam MSSA e, 1,5% (1 de 68) possuíam MRSA. Não foi identificado *S. aureus* nas amostras de 82,3% (56 de 68) indivíduos

Os grupos de estudo foram comparados ao grupo controle (Comunidade) utilizando o teste χ^2 . O resultado de cada teste e o valor de “P” estão expressos na Tabela 14.

Todos os grupos de estudo tiveram diferença significativa do grupo comunidade em relação a frequência de portadores de *S. aureus* e MRSA. Esses resultados validam os números obtidos nos grupos de estudo, deixando clara a maior associação de linhagens MRSA ao ambiente hospitalar, embora trabalhos realizados em outros países vêm indicando um crescente aumento de linhagens MRSA em indivíduos da comunidade, sem qualquer vínculo com hospitais [71, 118, 119].

Tabela 14. Resultados dos testes estatísticos realizados com o grupo controle Comunidade.

Comparação	Tipo	Valor de χ^2	Significância
Comunidade X Equipe Médica	<i>S. aureus</i> x não <i>S. aureus</i>	1,325	P ≤ 0,001
Comunidade X Equipe Médica	MRSA x MSSA	5,837	P = 0,016
Comunidade X Técnicos	<i>S. aureus</i> x não <i>S. aureus</i>	1,467	P ≤ 0,001
Comunidade X Técnicos	MRSA x MSSA	1,495	P ≤ 0,001
Comunidade X Alunos	<i>S. aureus</i> x não <i>S. aureus</i>	1,796	P ≤ 0,001
Comunidade X Alunos	MRSA x MSSA	1,811	P ≤ 0,001

4.6 Caracterização molecular de *S. aureus* a partir das amostras coletadas

Uma vez que os procedimentos de caracterização microbiológica e bioquímica de linhagens de *S. aureus* correspondem a procedimentos relativamente trabalhosos, que levam cerca de 2 a 4 dias para gerarem resultados confirmatórios, este trabalho teve como segundo objetivo propor metodologias diagnósticas alternativas, empregando técnicas moleculares, especificamente a PCR. Tal proposição baseou-se na rapidez e alta especificidade de tais testes.

Para tanto, propusemos o uso da técnica de PCR, no sentido de detectarmos a presença de genes específicos de *S. aureus*. Os genes escolhidos foram aqueles que codificam a proteína A, presente na superfície das células de *S. aureus*, o gene de coagulase, a fim de substituir a necessidade do teste de coagulação de plasma de coelho, e o gene que codifica a DNase termoestável, um marcador típico de *S. aureus*.

Além de genes específicos de *S. aureus*, também realizamos experimentos de PCR visando detectar a presença de genes associados à resistência à metilina e à vancomicina.

Desta forma, tal tipo de abordagem possibilitaria, a partir da extração direta de DNA das amostras coletadas, uma ampla análise molecular que permitiria simultaneamente, a detecção de portadores de *S. aureus* e a detecção de linhagens MRSA e MSSA em cada indivíduo.

Embora tais aspectos teóricos sejam absolutamente verdadeiros, haja visto o grande número de testes diagnósticos moleculares atualmente disponíveis para uma série microrganismos, nos deparamos com muitas dificuldades em nosso trabalho, as quais retardaram sobremaneira a execução dos experimentos de PCR. Contudo,

nossos resultados preliminares são bastante promissores, indicando que tais metodologias, após sua otimização para o caso de *S. aureus*, poderão corresponder a alternativas confiáveis e bastante adequadas ao diagnóstico deste microrganismo, a partir de espécimes clínicos.

Abaixo são descritos os resultados desta abordagem molecular, onde descremos os principais problemas e soluções encontrados, bem como os resultados obtidos.

4.6.1 Extração de DNA

As amostras caracterizadas como *S. aureus* foram inoculadas em meio LB e após a incubação por uma noite, foram submetidas aos protocolos de extração de DNA total.

Uma vez que as células de *S. aureus* caracterizam-se pela presença de uma espessa parede celular, contendo várias camadas de peptidoglicano, os diferentes procedimentos de extração de DNA adotados neste trabalho mostraram-se bastante insatisfatórios, uma vez que seu rendimento freqüentemente era muito baixo (Figura 10 e 11).

Embora existam reagentes, tais como lisozima e *lysostaphin*, utilizados especificamente na extração de DNA de células de *S. aureus*, tais reagentes são de alto custo, particularmente o *lysostaphin*. Tal fato comprometeu esta etapa, visto que não dispúnhamos de verbas para sua aquisição. Além disso, consideramos que para adotar metodologias moleculares de diagnóstico, é essencial que estas não apresentem custos muito mais elevados que os procedimentos rotineiramente adotados em laboratórios hospitalares de microbiologia.

Assim, após inúmeras tentativas, empregando diversos protocolos distintos, optamos por utilizar um procedimento de lise celular mediada pelo tratamento das amostras com fenol (Figura 10).

Apesar de resultar em um rendimento ainda relativamente baixo, a metodologia apresentada neste trabalho foi a que apresentou os melhores resultados (Figura 10).

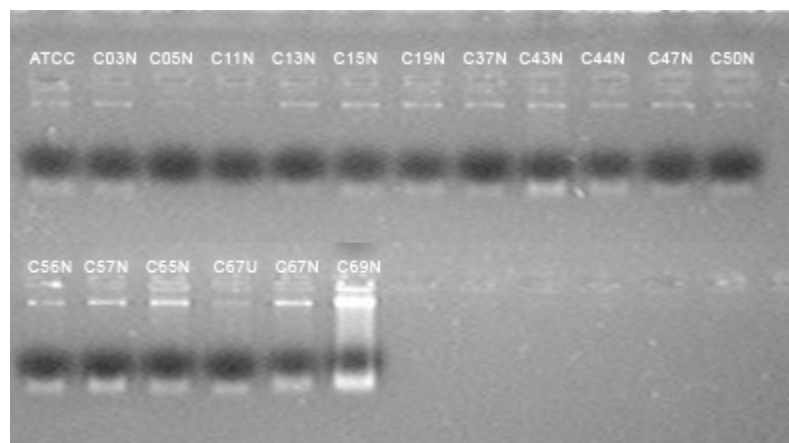


Figura 9. Perfil eletroforético em gel de agarose corado com brometo de etídio de DNA total extraído de amostras de *S. aureus*, isoladas do nariz de indivíduos do grupo Comunidade utilizando o protocolo descrito neste trabalho. No primeiro poço, foi aplicada uma amostra do DNA total extraído da linhagem 29213 ATCC

4.6.2 Reações de PCR para a detecção de genes específicos de *S. aureus* e do gene *mecA*, que confere resistência à oxacilina.

Os experimentos de PCR foram realizados com o intuito de confirmar a identificação bioquímica de *S. aureus* e a presença do cassete cromossomal *SCCmec*, que confere a resistência à oxacilina.

Os genes escolhidos para identificação da espécie *S. aureus* foram: PtnA (proteína A), Coa (coagulase) e nuc (nuclease termoestável) Para identificação de linhagens MRSA, foi escolhida uma região do gene *mecA* que é conservada em todos os subtipos descritos deste cassete cromossomal.

Todas as amostras identificadas como positivas, em todos os grupos de estudo, foram submetidas aos testes de PCR. No entanto, em virtude das dificuldades enfrentadas no procedimentos iniciais de extração de DNA, os resultados mostravam-se pouco reprodutíveis (Figura 11).

Além disso, por questões alheias à nossa vontade, quando definimos o procedimento adequado de extração de DNA, havíamos perdido um grande número das amostras isoladas do HUB. Assim, como dispúnhamos de todas as amostras coletadas da comunidade e dos pacientes, estas foram escolhidas para a realização dos ensaios moleculares.

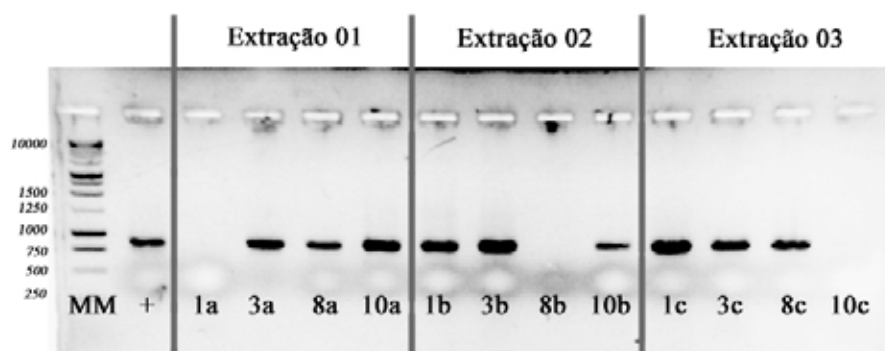


Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose corado com brometo e etídio dos fragmentos amplificados na reação de PCR realizada com iniciadores específicos do gene *mecA*. O ensaio foi realizado com DNA de amostras de pacientes (1, 3, 8, 10) provenientes de 3 extrações distintas (a, b, c). A metodologia de extração realizada foi a mesma (fervura/centrifugação), diferindo apenas pela data do procedimento.

Todas as amostras de comunidade previamente identificadas como *S. aureus*, foram positivas nos três ensaios de PCR (PtnA, Coa e nuc: Figura 12) para confirmação da identificação bioquímica da espécie *S. aureus* (Figura 11). Em relação às amostras de pacientes, das 48 que dispúnhamos, 45 foram positivas e 3 negativas, confirmando assim os resultados obtidos na caracterização microbiológica (Figura 13).

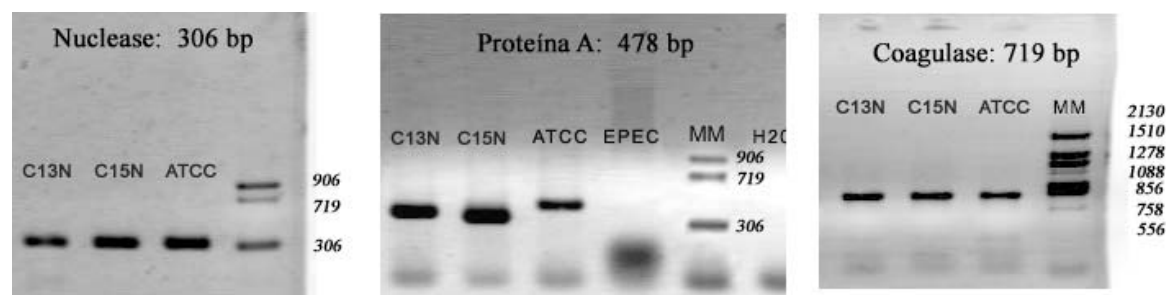


Figura 11. Perfil eletroforético em gel de agarose corado com brometo de etídio dos fragmentos amplificados por PCR empregando-se os iniciadores específicos para os genes de nuclease, proteína A e coagulase, a partir de amostras de DNA de isolados de comunidade. Os resultados obtidos corroboram aqueles dos testes bioquímicos.

Curiosamente, no ensaio de PCR visando a detecção do gene *mecA*, todas as amostras de pacientes exibiram resultado positivo, incluindo aquelas negativas para os genes típicos de *S. aureus* (PtnA, Coa e nuc) (Figura 13). Tais resultados sugerem que três das amostras de pacientes enviadas pelo HUB correspondem a linhagens de *Staphylococcus* coagulase-negativas, resistentes à oxacilina. Quanto às amostras de comunidade, apenas uma amostra foi positiva neste teste, novamente confirmando os

resultados anteriormente obtidos pelos métodos convencionais.

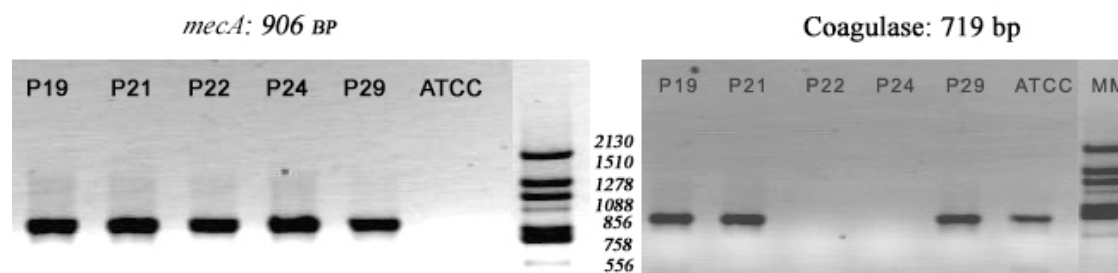


Figura 12. Perfil eletroforético, em gel de agarose corado com brometo de etídio, dos produtos de amplificação resultantes de ensaios de PCR empregando-se os iniciadores específicos para os genes de coagulase e *mecA*, a partir de amostras de DNA de isolados de pacientes.

Técnicas moleculares como PCR e Real-Time PCR estão sendo utilizadas em diversos hospitais na identificação de MRSA provenientes de pacientes e de funcionários [106-109]. O uso dessas metodologias em geral emprega *kits* comerciais, que possuem um custo elevado.

A vantagem do uso dessa tecnologia frente às técnicas tradicionais são evidenciadas no controle de surtos de infecção hospitalar por MRSA. A rápida identificação de infecções e de portadores seguido de isolamento demonstrou ser eficiente em evitar uma disseminação [109]. Em contrapartida, o uso de metodologias tradicionais para a detecção destes pacientes pode gerar uma identificação tardia, muitas vezes inutilizando o isolamento do paciente [109-111].

Nossos resultados indicam que os três pares de iniciadores desenvolvidos para identificação da espécie possuem alta especificidade, enquanto o par desenvolvido para detecção do gene *mecA* possui uma grande abrangência, sendo teoricamente capaz de identificar todos subtipos de *SCCmec* já descritos para *S. aureus*. De fato, todas as amostras que apresentaram crescimento na presença de oxacilina tiveram amplificação de fragmento no tamanho esperado. Todos os quatro pares de iniciadores possuem temperatura teórica de anelamento próxima e fragmentos resultantes da amplificação por PCR com tamanhos distintos. Isso talvez possibilite o uso de múltiplos pares de iniciadores em uma única reação, o que diminuiria o custo e o tempo necessários para a identificação de uma amostra.

Todos os ensaios com os iniciadores mencionados foram otimizados para uma temperatura de anelamento a 45 °C.

Os ensaios com o par de iniciadores para detecção do gene relacionado a resistência à vancomicina foi otimizado utilizando uma cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina pela presença do gene *vanA*. Porém nenhuma cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina foi encontrada.

5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclusões

Este trabalho identificou portadores assintomáticos de *S. aureus* em 44,87% da população analisada, sendo que destes 60,95% são portadores de MRSA. Dentre os indivíduos relacionados ao HUB, 56,02% dos indivíduos foram identificados como portadores de *Staphylococcus aureus*, sendo que destes, 64,74% foram identificados como portadores de MRSA, o que contrasta com o valor obtido na comunidade: 1,5%. Esses dados sugerem uma forte tendência entre pessoas vinculadas ao HUB de serem portadoras de MRSA.

Dentre os indivíduos relacionados ao HUB, alunos e funcionários da lavanderia são os grupos com a maior frequência de portadores de *Staphylococcus aureus*: 69,64% e 69,56% respectivamente. Dentre esses, 76,92% e 75,0% foram identificados como MRSA.

Importantes etapas na padronização de um protocolo molecular para identificação de *S. aureus* e genes de resistência à antibióticos foram concluídas, contudo mais estudos no desenvolvimento deste protocolo deverão ser realizados para uma futura utilização pelo hospital.

Perspectivas

- Otimizar extração de DNA a partir de culturas puras de *S. aureus*.
- Desenvolver procedimento de extração de DNA de *S. aureus* a partir de culturas mistas.
- Otimizar reação de PCR utilizando iniciadores específicos para DNA ribossomal bacteriano afim de obter um controle positivo interno das reações de PCR.
- Otimizar reação de PCR multiplex para identificação de *S. aureus* e MRSA.
- Estabelecer reação de RAPD.
- Comparar o perfil polimórfico de DNA, gerado a partir de ensaios de RAPD, entre as amostras de funcionários, pacientes e alunos.
- Analisar prevalência clonal entre as cepas isoladas de pacientes no HUB.
- Comparar clones prevalentes no HUB com clones epidêmicos nacionais e internacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - LACERDA, R. A.; EGRY, E. Y. As infecções hospitalares e sua relação com o desenvolvimento da assistência hospitalar: reflexões para análise de suas práticas atuais e controle. **Revista Latino-Americana Enfermagem**, v.5, n.4, p.13-23, Out. 1997.
- [2] - COUTO, R.T; PEDROSO, E. R.; PEDROSA, T. M. G. História do Controle da Infecção Hospitalar no Brasil e no Mundo. In: COUTO, R.C.; PEDROSA, E. R. P; NOGUEIRA, J. M. **Infecção Hospitalar e outras Complicações não Infeciosas da Doença – Epidemiologia, Controle e Tratamento**. São Paulo: MEDSI, 2003, cap.1, p. 3-8
- [3] - FERNANDES, A. T. As bases do hospital contemporâneo: a enfermagem, os caçadores de micróbios e o controle de infecção. **Infecções hospitalares e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu; 2000b. cap. 8, p.129-159.
- [4] - LERNER, K. L.; LERNER, B. W. **World of microbiology and immunology**. p.246-283, 1ed. EUA: Gale Group, 2002.
- [5] - LERNER, K. L.; LERNER, B. W. **World of microbiology and immunology**. p.326-329, 1ed. EUA: Gale Group, 2002.
- [6] - LERNER, K. L.; LERNER, B. W. **World of microbiology and immunology**. p.411-412, 1ed. EUA: Gale Group, 2002.
- [7] – LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.9, p.1265-1273, mai. 2003.
- [8] – KIRBY, W. M. M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. **Science**, v.99, n.2579, p.452-453, jun. 1944.
- [9] – CHAMBERS, H. F. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.178-182, mar.-abr. 2001.
- [10] - MARTIN, C. M. National Bacteremia Registry. **Journal of Infectious Diseases**, v.120, n.4, p.495-496, out. 1969.
- [11] – WILLIAMS, J. D.; LPOOL, M. D. Trials of five antibacterial creams in the control of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**. v.290, n.7512, p.390-392, 1967.
- [12] - BETHUNE, D.W.; BLOWERS, R.; PARKER, M.; PASK, E.A. Dispersal of *Staphylococcus aureus* by patients and surgical staff. **The Lancet**, v.285, n.7383, p.480-483, 1965.
- [13] – JESSEN, O.; ROSENDAL, K.; BULOW, P.; FABER, V.; ERIKSEN, K. R. Changing staphylococci and staphylococcal infections: A ten-year study of bacteria and cases of

bacteremia. **New England Journal of Medicine**, v.281, n.12, p.627-635, set. 1969.

[14] – CHEUNG, A.L.; BAYER, A.S.; ZHANG, G.; GRESHAM, H.; XIONG, Y.Q. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v.40, n.1, p.1-9, jan. 2004.

[15] –HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant: *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet infectious diseases**, v.1, n.3, p.147-155, out. 2001.

[16] – WASHERA, P.; JOFFE, H. The “hospital superbug”: Social representations of MRSA. **Social Science & Medicine**, v.63, n.8, p.2141-2152, out. 2006.

[17] – ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X. X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, vol.6, n.1, p.41-52, fev. 2003.

[18] – JEVONS, M. P. “Celbenin”- resistant staphylococci. **British Medical Journal**, v.124, p.124-125, jan. 1961.

[19] – FATTOM, A. I.; HORWITH, G.; FULLER, S.; PROPST, M.; NASO, R. Development of StaphVax, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the la bench to phase III clinical trials. **Vaccine**, v.22, n.7, p.880-887, fev. 2004.

[20] - CEPEDA, J. A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; SHAW, S. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two center study **The Lancet**, v.365, n.9456, p.295-304, jan. 2005.

[21] – KNIEHL, E.; BECKER, A.; FORSTER, D. H. Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. **Journal of Hospital Infection**, v.59, n.3, p.180-187, mar. 2005

[22] – GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical infectious diseases**, v.46, n.S5, p.S350-S359, jun. 2008.

[23] – KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v.357, n.9264, p.1225-1240, abr. 2001.

[24] – DANCER, S. J. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus acquisition: the case for hospital cleaning. **The Lancet infectious diseases**, v.8, n.2, p.101-113, fev. 2008.

[25] – NEELY, A.; MALEY, M. Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic, **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.724–726, fev. 2000.

[26] - DIETZE, B.; RATHY, A.; WENDTZ, C.; MARTINY, H. Survival of MRSA on sterile goods packaging. **Journal of Hospital Infections**, v.49, n.4, p.255-261, dez. 2001.

[27] - KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido**. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2005.

[28] – ARCHER, G. L. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. **Clinical infectious diseases**, v.26, n.5, p.1179-1181, mai. 1998.

[29] – SHEAGREN, J. N. *Staphylococcus aureus*: The persistent pathogen. **New England Journal of Medicine**, v.310, n.21, p.1368-1373, mai. 1984.

[30] - VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; FRÉNAY, H. M. E.; VAN KLINGEREN B.; SAVELKOUL T. F.; VERHOEF, J. Control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Dutch University Hospital, **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** v.10, n.1, p.6-11, jan. 1991.

[31] – BANFIELDA, K. R.; KERRB, K. G. Could hospital patients' hands constitute a missing link? **Journal of Hospital Infection**, v.61, n.3, p.183-188, nov. 2005.

[32] – PRESCOT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiology* p.819-820, 5ed. EUA: The McGraw–Hill Companies, 2002.

[33] - ZHANG, H. Z.; HACKBARTH, C. J.; CHANSKY, K. M.; CHAMBERS, H. F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to betalactamsin staphylococci. **Science**, v.291, n.5510, p.1962–1965, mar. 2001.

[34] - HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v.9, n.10, p.486-493, out. 2001.

[35] - ARCHER, G. L.; NIEMEYER, D. M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. **Trends in microbiology**, v.2, n.10, p.343–347, out. 1994.

[36] - COUTO, I.; WU, S. W.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.2, p.645–653, jan. 2003.

- [37] – LEVINE, D. P. Vancomycin: A History. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.1 p.S5–S12, jan. 2006.
- [38] - MURRAY BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**, v.342, n.10, p.710-721, mar. 2000..
- [39] - DEPARDIEU F, BONORA MG, REYNOLDS PE, COURVALIN P. The vanG glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. **Molecular Microbiology**, v.50, n.3, p.931-948, nov. 2003.
- [40] - MCKESSAR SJ, BERRY AM, BELL JM, TURNIDGE JD, PATON JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.3224-4228, jan. 2000.
- [41] - *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States, **Morbidity and mortality weekly report**, v.51, n.26, p.565–567, jul. 2002.
- [42] – SWENSON, J. C.; NEUHAUS, F. C. Biosynthesis of Peptidoglycan in *Staphylococcus aureus*: Incorporation of the Nc-Ala-Lys Moiety into the Peptide Subunit of Nascent Peptidoglycan. **Journal of Bacteriology**, v.125, n.2, p.626-634, fev. 1976.
- [43] - THIRUCHELVAM, N.; YEOH, S. L.; KEOGHANE, S. R. MRSA in Urology: A UK Hospital Experience. **European Urology**, v.49, n.5, p.896-899, mai. 2006.
- [44] - WANG, F. D.; CHEN, Y. Y.; CHEN, T. L.; LIU, C. Y. Risk factors and mortality in patients with nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia. **American journal of infection control**, v.36, n.2, p.118-122, mar. 2008.
- [45] - DELANEY, J. C.; SCHNEIDER-LINDNER, V.; BRASSARD, P.; SUISSA, S. Mortality after infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) diagnosed in the community **BMC Medicine**, v.6 n.1, p.2-10, jan 2008
- [46] – BJÖRHOLT, I.; HAGLIND, E. Cost-savings achieved by eradication of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA)-16 from a large teaching hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.23, n.9, p.688-695, set. 2004.
- [47] - NULENS, E.; BROEX, E.; AMENT, A.; DEURENBERG, R. H.; SMEETS, E.; SCHERES, J.; VAN TIEL, F. H.; GORDTS, B.; STOBBERINGH, E. E.; Cost of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch university hospital. **Journal of Hospital infection**, v.68, n.4, p.301-307, abr. 2008.
- [48] - KOPP, B. J.; NIX, D. E.; ARMSTRONG, E. P. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. **The Annals of pharmacotherapy**, v.38 n.9, p.1377-1382, set. 2004.

- [49] - KANERVA, M.; BLOM, M.; TUOMINEN, U.; KOLHO, E.; ANTTILA, V. J.; VAARA, M.; VIROLAINEN-JULKUNEN, A.; LYYTIKÄINEN, O. Costs of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of hospital infection**, v.66 n.1, p.22-28, mai. 2007.
- [50] – TIEMERSMA, E. W.; BRONZWAER, S. L. A. M.; LYYTIKÄINEN, O.; DEGENER, J. E.; SCHRIJNEMAKERS, P.; BRUINSMA W. W.; HAJO G.; MONEN, J. WOLFGANG, W.; H. G. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. **Emerging infectious diseases**, v.10 n.9, p.1627-1634, set. 2004.
- [51] - PERRY, J. D.; RENNISON, C.; BUTTERWORTH, L. A.; HOPLEY, A. L. J.; GOULD, F. K. Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v.41, n.12, p.5695-5698, dez. 2003.
- [52] - RAJAN, L.; SMYTH, E.; HUMPHREYS, H. Screening for MRSA in ICU patients. How does PCR compare with culture?. **Journal of Infection**, v.55, n.4, p.353-357, out. 2007.
- [53] - KLUYTMANS, J. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the value of rapid tests. **The Journal of hospital infection**, v.65, n.2, p.100-104, jun 2007.
- [54] - CUNNINGHAM, R.; JENKS, P.; NORTHWOOD, J.; WALLIS, M.; FERGUSON, S.; HUNT, S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care **Journal of Hospital Infection**, v.65, n.1, p.24-28, jan. 2007.
- [55] – SENNA, J. P. M.; PINTO, C. A.; BERNARDON, D. R.; FRANCISCO, A. G.; EPZTEIN, E.; RITT, C. B.; OPPERMAN, C.; SANTOS, D. S. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among care-workers and patients in an emergency hospital. **Journal of Hospital Infection**, v.54, n.2, p.167-168, jun. 2003.
- [56] – HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, v.350, n.9092, p.1670-1673, dez. 1997.
- [57] - HARDY, K. J.; SZCZEPURA, A.; DAVIES, R.; BRADBURY, A.; STALLARD, N.; GOSSAIN, S.; WALLEY, P.; HAWKEY, P. M. A study of the efficacy and cost-effectiveness of MRSA screening and monitoring on surgical wards using a new, rapid molecular test (EMMS). **BMC Health Services Research**, v.7, n.1, p.160-167, out. 2007.
- [58] - ENRIGHT, M. C.; DAY, N. P.; DAVIES, C. E.; PEACOCK, S. J.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v.38 n.3,

p.1008-1015, mar. 2000.

[59] - TEIXEIRA, L. A.; RESENDE, C. A.; ORMONDE, L. R.; ROSENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A. M.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v.33 n.9, p.2400-2404, set. 1995.

[60] - CORSO, A.; SANTOS SANCHES, I.; AIRES DE SOUSA, M.; ROSSI, A.; DE LENCASTRE, H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. **Microbial drug resistance**, v.4, n.4, p.277-288, jan. 1998.

[61] – DIEP, B. A.; GILL, S. R.; CHANG, R. F.; PHAN, T. H.; CHEN, J. H.; DAVIDSON, M. G.; LIN, F.; LIN, J.; CARLETON, H. A.; MONGODIN, E. F.; SENSABAUGH, G. F.; PERDREAU-REMINGTON, F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v.367 n.9512, p.731-739, mar. 2006.

[62]- NIKBATKHT, M.; NAHAEI, M. R.; AKHI, M. T.; ASGHARZADEH, M.; NIKVASH, S. Molecular fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients and staff of two Iranian hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v.69, n.1, p.46-55, mai. 2008.

[63]- CASEY, A.; WORTHINGTON, T.; CADDICK, J.; HILTON, A.; LAMBERT, P.; ELLIOTT, T. RAPD for the typing of *Staphylococcus aureus* implicated in nosocomial infections. **Journal of Hospital Infection**, v.66, n.2, p.192-193, jun. 2007.

[64]- - KURLEND, J. GRINHOLC, M. JASEK, K. WEGRZYN, G. Rapid typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A 7-year experience in a Polish hospital. **Medical Science Monitor**, v.13, n.6, p.MT13-18, nov. 2007.

[65]- FASCIA, P.; MARTINA, I.; MALLAVALA, F.; GRATTA, F.; POZZETTO, B.; LUCHTA, F.; BERTHELOTA, P. Implication potentielle d'étudiants infirmiers dans la transmission de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline lors d'une épidémie nosocomiale. **Pathologie Biologie**, v.51, n.8, p.479-482, out. 2003.

[66]– ALBRICH, W. C.; HARBARTH, S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA?. **The Lancet Infectious Disease**, v.8, n.5, p.289-301, mai. 2008.

[67] BELKUM, A. VAN; KLUYTMANS, J.; LEEUWEN, W. VAN; BAX, R.; QUINT, W.; PETERS, E.; FLUIT, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; BRULE, A. VAN DEN; KOELEMAN, H. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.6, p.1537-1547, jun. 1995.

[68]- HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K. Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, n.1, p.135-136, jul. 1997.

[69]- HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.10, p. 486-493, out. 2001.

[70] – NEOH, H. M.; HORI, S.; KOMATSU, M.; OGURI, T.; TAKEUCHI F.; CUI, L.; HIRAMATSU, K. Impact of reduced vancomycin susceptibility on the therapeutic outcome of MRSA bloodstream infections. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.6, n.13, p.1-6, out. 2007.

[71] - . LU, P.; CHIN, L.; PENG, C.; CHIANG, Y.; CHEN, T.; MA, L.; SIU, L. S. Risk Factors and Molecular Analysis of Community Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.132-139, jan. 2005.

[72] – MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.2, p.147-150, 2007.

[73]- BALIGA, S.; BANSIL, R.; SUCHITRA, U.; BHARATI, B.; VIDYALAKSHMI, K.; SHENOY, S. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in medical students. **Journal of Hospital Infection**, v.68, n.1, p.91-92, jan. 2008.

[74] – MORITA, J.E.; FUJIOKA, R.S.; TICE, A.D.; BERESTECKY, J.; SATO, D.; SEIFRIED, S.E.; KATZ, A.R. Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in healthy college students, Hawaii. **Hawaii Medical Journal**, v.66, n.8, p.213-215, ago. 2007.

[75] – DANCER, S. J. Considering the introduction of universal MRSA screening. **Journal of Hospital Infection**, v.69, n.4, p.188-199, p.315-320, ago. 2008.

[76] – SAIMAN, L.; CRONQUIST, A.; WU, F.; ZHOU, J.; RUBENSTEIN, D.; EISNER, W.; KREISWIRTH, B. N.; DELLA-LATTA, P. An outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.24, p.317-321, mai. 2003.

[77] – BERTIN, M. L.; VINSKI, J.; SCHMITT, S.; SABELLA, C.; DANZIGER-ISAKOV, L.; MCHUGH, M.; PROCOP, G. W.; HALL, G.; GORDON, S. M.; GOLDFARB, J. Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization and Infection in a Neonatal Intensive Care Unit Epidemiologically Linked to a Healthcare Worker With Chronic Otitis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.27, n.6, p.581-585, jun. 2006.

[78]-OLIVEIRA, D.; SANCHES, I. S.; TAMAYO, M.; RIBEIRO, G.; COSTA, D.; DE LANCESTRE, H. Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospital are caused

by two internationally spread multiresistant strains: the 'Iberian' 'Brazilian' clones of MRSA. **Clinical Microbiology and Infection**, v.4, n.7, p.373-384, jul. 1998.

[79]- MELTER, O.; SANTOS, S. I.; SCHINDLER, J.; DE SOUSA, M. A.; MATO, R.; KOVÁROVA, V.; ZEMLICKOVÁ, H.; DE LENCASTRE, H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. **Journal of clinical microbiology**, v.37, n.9, p.2798-2803, set 1999

[80]- CAMPANILE, F.; CAFISO, V.; CASCONI, C.; GIANNINÒ, V.; DI MARCO, O.; STEFANI, S. Clonal diffusion and evolution of *mecA* and Tn554 polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italy. **Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v.9, n.1, p.30-38, mar. 2001.

[81]- DA SILVA COIMBRA, M. V.; TEIXEIRA, L. A.; RAMOS, R. L.; PREDARI, S. C.; CASTELLO, L.; FAMIGLIETTI, A.; VAY, C.; KLAN, L.; FIGUEIREDO, A. M. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. **Journal of medical microbiology**, v.49, n.2, p.187-192, fev. 2000.

[82] - AIRES DE SOUSA, M.; / MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; AVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S. T.; BRANDILEONE, M. C.; DE LENCASTRE, H. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **Journal of clinical microbiology**, v.39, n.6, p.2197-2205, jun. 2001.

[83] - SENNA, J. P. M.; PINTO, C. A.; MATEOS, S.; QUINTANA, A.; SANTOS, D. S. Spread of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Uruguayan and South of Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v.53 n.2, p.156-157, fev. 2003.

[84] - DE SOUZA, M. A.; CRISOSTOMO, M. I.; SANCHES, I. S.; FUZHONG, J.S.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE H. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.159-163, jan. 2003.

[85] - MELO, M. C. N.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FERREIRA, R. L.; COELHO, L. R.; SOUZA, R. R.; GOBBI, C. N.; ROZENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A. M. S. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. **Journal of hospital infection**, v.58 n.4, p.276-285, dez. 2004.

[86] - LAMARO-CARDOSO, J.; CASTANHEIRA, M.; DE OLIVEIRA, R. M.; E SILVA, S. A.; PIGNATARI, A. C. C.; MENDES, R. E.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L. S. S. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v.57 n.4, p.467-470, abr. 2007.

- [87] - OLIVEIRA, G. A.; DELL'AQUILA, A. M.; MASIERO, R. L.; LEVY, C. E.; GOMES, M. S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E. M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America**, v.22 n.7, p.443-448, jul. 2001.
- [88] - GUILARDE, A. O.; TURCHI, M. D.; MARTELLI, C. M. T.; PRIMO, M. G. B. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. **Journal of hospital infection**, v.63 n.3, p.330-336, jul. 2006.
- [89] – SILVA, H. A.; ABDALLAH, V. O. S.; CARNEIRO, L. C.; FILHO, P. P. G. Infection and Colonization by *Staphylococcus aureus* in a High Risk Nursery of a Brazilian Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.6, p.381-386, 2003.
- [90] - HESHIKI, Z.; QUESADA, R. M. B.; HESHIKI, R. E.; JOAQUIM, D. M.; BRANDÃO L. G. Nasal bacteriological flora: a study among medical residents of Londrina University Hospital – Parana State – Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.23, p.3-10, jan./dez. 2002
- [91] - CHABERNY, I. F.; ZIESING, S.; MATTNER, F.; BARWOLFF, S.; BRANDT, C.; ECKMANNS, T.; RUDEN, H.; GASTMEIER, P. The burden of MRSA in four German university hospitals. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.208, n.6, p.447-453, nov. 2005.
- [92] - . SAFDAR, N.; MARX, J.; MEYER, N. A.; MAKI, D. G. Effectiveness of preemptive barrier precautions in controlling nosocomial colonization and infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit. **American journal of infection control**, v.34 n.8, p.476-483, out. 2006.
- [93] - M. MOREIRA, E.A.S. MEDEIROS, A.C.C. PIGNATARI, S.B. WEY, D.M. CARDO, Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.44, n.4, p.263-268, 1998
- [94] – LARSSENA, K. W.; JACOBSENA, T.; BERGHA, K.; TVETEB, P.; KVELLOC, E.; SCHEELA, O. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two nursing homes in Central Norway. **Journal of Hospital Infection**, v.60, n.4, p.312-316, ago. 2005.
- [95] - JUMAAA, P. A.; HATELEYC, P. M.; BACONB,S.; SALABSALOB, F. L.; NERINGERB R. Experience applying the UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) guidelines in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates 1999–2002: same guidelines, different cultures. **Journal of Hospital Infection**, v.67, n.4, p.323-328, dez. 2007.
- [96] - WERTHEIM, H. F. L.; VOS, M. C.; BOELENS, H. A. M.; VOSS, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; MEESTER, M. H. M.; KLUYTMANS, J. A. J. W.; VAN KEULEN, P. H. J.; VERBRUGH, H. A. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search

and destroy and restrictive antibiotic use. **Journal of Hospital Infection**, v.56, n.4, p.321-325, abr. 2004.

[97]– SCHUENCK, R.P.; PEREIRA, E. M.; IORIO, N. L.; DOS SANTOS, K. R. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v.52, n.3, p.431-435, fev. 2008.

[98] - von Eiff, C.; Proctor, R. A.; Peters, G. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. **Postgraduate medicine**, v.110, n.4, p.73-76, out. 2001.

[99] – KUMAR, D.; CAWLEY, J.J.; IRIZARRY-ALVARADO, J.M.; ALVAREZ, A.; ALVAREZ, S. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. **Transplant Infectious Disease**, v.9, n.4, p.336-338, dez. 2007.

[100] – POTTUMARTHY, S.; SCHAPIRO, J. M.; PRENTICE, J. L.; HOUZE, Y. B.; SWANZY, S. R.; FANG, F. C.; COOKSON B. T. Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Masquerading as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5881-5884, dez. 2004.

[101] –PRADO, M. A. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) em profissionais de saúde e as interfaces com as infecções nosocomiais. **Revista Eletrônica de Enfermagem (on-line)**, v.9, n.3, p.880-882, set.-dez. 2007.

[102] – BUSATO, C. R.; GABARDO, J.; LEÃO, M. T. C. Profissionais da saúde portadores de *Staphylococcus aureus* – persistência e resistência evolutiva. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.1, p.11-19, mar./jun. 2007.

[103]– MURPHY, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among junior doctors. **Journal of Hospital infection**, v.68, n.2, p.188-199, fev. 2008.

[104]– MACFARLANE, L.; WALKER, J.; BORROW, R.; OPPENHEIM, B. A.; FOX, A. J. Improved recognition of MRSA case clusters by the application of molecular subtyping using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Hospital infection**, v.41, n.1, p.29-37, jan. 1999.

[105]– LEEA, E. S.; SONGA, J. S.; HWANGA, S. J.; SUHA, H. K.; CHEONGB, H. J. Possibility of reciprocal infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between medical personnel and patients undergoing middle ear surgery, **Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Related Specialities**, v.63, n.2, p.87-91, 2001.

[106]- HARDY, K. J.; SZCZEPURA, A.; DAVIES, R.; BRADBURY, A.; STALLARD, N.; GOSSAIN, S.; WALLEY, P.; HAWKEY, P. M. A study of the efficacy and cost-effectiveness of MRSA screening and monitoring on surgical wards using a new, rapid molecular test (EMMS). **BMC Health Services Research** v.7, n.160, p.1-8, out. 2007.

[107]– GILPINA, D. F.; TUNNEYA, M. M.; FUNSTONB, C.; SAVAGEB, K.; GARDINERB, A.; KEARNEYB M. P. Rapid detection of MRSA in a routine diagnostic

laboratory using a real-time PCR assay. **Journal of Hospital Infection**, v.67, n.1, p.97-99, set. 2007.

[108]- WARREN, D. K.; LIAO, R. S.; MERZ, L. R.; EVELAND, M.; DUNNE, W. M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay, **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p.5578-5581, dez. 2004.

[109]- CUNNINGHAM, R.; JENKS, P.; NORTHWOOD, J.; WALLIS, M.; FERGUSON, S.; HUNB, S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. **Journal of Hospital Infection**, v.65, n.1, p.24-28, jan. 2007.

[110]- CEPEDA, J. A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; HAYMAN, S.; COOKSON, B.; SHAW, S.; KIBBLER, C.; SINGER, M.; BELLINGAN, G.; WILSON, A. P. R. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. **The Lancet**, v.365, n.9456, p.295-304, jan. 2005.

[111] – DUCKWORTH, G.; LAI R.; EBRAHIM S.; COOPER, B. S.; STONE, S. P.; KIBBLER, C. C.; COOKSON, B. D.; ROBERTS, J. A.; MEDLEY, G. F. Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. **BMJ**, v.329, n.533, p.1-8, set. 2004.

[112] – ZELANTE, F.; ASHCAR, H.; PIOCHI, B. J. A.; MONSON, C. A.; CUNHA, P. S. *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos sãos. Verificação de identidade entre as cepas isoladas. **Revista Saúde Pública**, v.16, p. 92-96, 1982.

[113] - JEVONS, M. P.; WILLIAMS, R. E. Nasal staphylococci and sepsis in hospital patients. **British Medical Journal**, v.2, n.5153, p.658-662, out. 1959.

[114] - VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **The New England Journal of Medicine**, v.344, n.1, p.11-16, jan. 2001.

[115] – STUBBS, E.; PEGLER, M.; VICKERY, A.; HARBOUR, C. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Australian (pre-clinical and clinical) medical students. **Journal of Hospital Infection**, v.27, n.2, p.127-134, jun. 1994.

[116] – SANTOS, B. M. de O. Estudo longitudinal sobre portador são de *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.4, p.395-400, jul.-ago. 1999.

[117]- COIA, J. E.; DUCKWORTH, G. J.; EDWARDS, D. I.; FARRINGTON, M.; FRY, C.; HUMPHREYS, H.; MALLAGHAN, C.; TUCKER, D. R. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. **Journal of Hospital Infection**, v.63, n.S, p.S1-S44, abr. 2006.

[118] – NIMMOA G. R.; COOMBSB, G.W. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. **International Journal of Antimicrobial**

Agents, v.31, n.5, p.401-410, mai. 2008.

[119] – MILLAR, B. C.; PRENDERGAST, B. D.; MOORE, J. E. Community-associated MRSA (CA-MRSA): an emerging pathogen in infective endocarditis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.61, n.4, p.966-967, abr. 2008.

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM/UnB
Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-900 – Brasília, DF
Telefone: (61) 307-2520

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: **CEP-FM 061/2005**

Título: **“Estudo epidemiológico com *Staphylococcus aureus* em ambientes hospitalares”**

Pesquisador responsável: **Cynthia Maria Kyaw**

Documentos analisados: **Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) do pesquisador(es)**

Data de entrada: **09/08/2005**

Proposição do(a) Relator(a):

- Aprovação**
 Aprovação com pendências
 Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: **31/08/2005**

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: **13/09/2005**

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS n.º 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, a Coordenação do CEP-FM decidiu **APROVAR “ad referendum”**, de acordo com o parecer da Coordenação, o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observação:

- 1 - Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves.
- 2 - O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília-DF, 26 de setembro de 2005.

Dr.ª Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do CEP-FM/UnB

APÊNDICE A

FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA-HOSPITALAR

APÊNDICE B

FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA-COMUNIDADE



Universidade de Brasília
Laboratório de Microbiologia

Identificação da amostra

«NOME»

Nome		
Endereço		
Nascimento	Sexo M F	Identidade
Peso Kg	Altura M	Telefone/ celular
Profissão		
Local de Trabalho	Função	Telefone comercial
Outros locais de trabalho	Função	Telefone comercial

IMPORTANTE: Possui algum parente, amigo ou pessoa próxima, que trabalha ou esteve em contato direto com qualquer hospital, clínica ou laboratório clínico / microbiológico, por mais de 1 mês no último ano?

Sim

Não

Data: ____ / ____ / ____

ass. _____

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Microbiologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,

abaixo assinado, declaro ter sido plenamente esclarecido, ter lido e ouvido o presente termo de responsabilidade que me informa estar ciente de:

- a) Que pelo presente documento concordo em participar da pesquisa “Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* em ambiente hospitalar no Distrito Federal”, executado por pesquisadores do Departamento de Biologia Celular, da Universidade de Brasília.
- b) Que este projeto visa ao desenvolvimento da pesquisa científica no Brasil, buscando novas metodologias para a análise de indivíduos portadores de *S. aureus* em ambiente hospitalar.
- c) Que essa participação implicará na doação de amostras nasais e sub-ungueais, coletadas por meio de “swabs” estéreis umidificados em solução salina estéril, sendo que esse material será utilizado inoculação de meios de cultura acelulares, visando o isolamento e posterior identificação de *S. aureus* e, eventualmente, outros microrganismos implicados em casos de infecção hospitalar.
- d) Que a doação do material não implicará em risco à minha saúde ou em qualquer desconforto físico adicional.
- e) Que a participação na pesquisa também implicará no fornecimento de dados pessoais como tais como idade, sexo e dados clínicos gerais.
- f) Que essa participação é voluntária, não implicando em nenhuma forma de pagamento, além de ser assegurada a privacidade do participante e a confidencialidade dos dados.
- g) Que a recusa em participar do projeto poderá ser feita a qualquer tempo, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento e que ficarei livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, bastando a comunicação ao responsável.

Brasília, ____ de _____ de 2008.

Assinatura: _____

Documento de identidade: _____

Responsável pelo projeto: _____

Telefones: (61) 3307-2176 r.4 / FAX (61) 3349-8411

APÊNDICE D

TABELA DE RESUMO COM OS RESULTADOS OBTIDOS

Resumo dos resultados da caracterização microbiológica

Grupos	Categoria	n	Portadores de		Portadores de	Sítio de extração		
			<i>S. aureus</i>	MRSA		Nasal	Sub-ungueal	Ambos
Alunos	Medicina	37	27 (72,9%)	21 (77,8%)	7 (33%)	11 (52,4%)	3 (14,2%)	
	Enfermagem	14	10 (71,4%)	7 (70%)	4 (57%)	2 (28,6%)	1 (14,2%)	
	Odontologia	5	2 (40%)	2 (100%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	
	Total	56	39 (69,6%)	30 (76,9%)	11 (36,7%)	14 (46,7%)	5 (16,7%)	
Equipe médica	Aux. enfer.	39	20 (51,3%)	10 (50%)	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	
	Médicos	16	5 (31,2%)	3 (60%)	1 (33%)	0 (0%)	2 (66%)	
	Enfermeiros	6	4 (66,7%)	1 (25%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Total	61	29 (47,5%)	14 (48,3%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)	
Técnicos	Administração	4	3 (75%)	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Cozinha	11	1 (9%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Higiene	4	2 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
	Lavanderia	23	16 (69,6%)	12 (75%)	3 (25%)	4 (33%)	5 (41,7%)	
	Serv. Gerais	7	3 (42,8%)	1 (33%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total	49	25 (51%)	19 (76%)	9 (47,4%)	5 (26,3%)	5 (26,3%)		