CILMARA POLIDO GARCIA

Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara Shafferman Levin

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Garcia, Cilmara Polido
Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar / Cilmara Polido Garcia. -- São Paulo, 2013.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Anna Sara Shafferman Levin.

Descritores: 1.*Staphylococcus aureus* 2.*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina 3.Recém-nascido 4.Fatores de risco 5.Unidades de terapia intensiva neonatal 6.Aleitamento materno 7.Gravidez 8.Educação

USP/FM/DBD-446/13

A todas as mães e aos seus bebês.

Aos meus pais, educadores.

Aos meus amados filhos, João, Tomás, Miguel.

Ao meu grande amor, Urbano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às equipes do berçário, centro obstétrico e maternidade, principalmente à Dra Vera Krebs, à Dra Roseli, ao Dr Marcelo Zugaib, ao Dr Mario Kondo, à Guta, à enfermeira Edi, à enfermeira Andrea, à enfermeira Maria de Jesus, à enfermeira Carla e à enfermeira Rosa.

Agradeço à equipe do LIM 54, principalmente à Dra Silvia Costa, à Juliana, ao Robson, à Andreia e à Inneke.

Agradeço à equipe do GCIH, à minha orientadora, às colegas Maura e Bia, à enfermeira Satiko e à Sueli.

Agradeço a Maria Helena Matté e sua equipe de laboratório.

Agradeço ao Matias, à Gabriela, à Paula, à Thaisa e à Kleiste.

Agradeço à secretaria de pós- graduação, principalmente à Roseli.

Agradeço a Ivaldo Silva, pelos campos lógicos.

Agradeço à Renata Pacheco e à Priscila Trindade.

Maria e Renata, nem sei como agradecer.

.

Come chocolates, pequena;

Come chocolates!

Olha que não há mais metafísica no mundo senão chocolates.

Olha que as religiões todas não ensinam mais que a confeitaria.

Come, pequena suja, come!

Pudesse eu comer chocolates com a mesma verdade com que comes!

Álvaro de Campos

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....2

2 OBJETIVOS 6

2.1 Objetivo Geral.....6

2.2 Objetivos Específicos.....6

3 METODOLOGIA.....8

3.1 Desenho do Estudo 8

3.2 Local, Período e População.....8

3.3 Desfecho.....10

3.4 Variáveis Explicativas 10

3.5 Procedimento de Coleta de Dados 14

3.6 Procedimento de Coleta de Material.....15

3.7 Métodos Laboratoriais 16

3.7.1 Métodos Microbiológicos.....16

3.7.2 Detecção do Gene *mec*A e do Gene da Coagulase 17

3.7.2.1 Extração do DNA Genômico.....18

3.7.2.2 Reação de Amplificação 19

3.7.2.3 Eletroforese.....20

3.7.3 Determinação do Espectro de Resistência a Agentes Antimicrobianos 20

3.7.3.1 Preparo da Solução Estoque do Antimicrobiano.....21

3.7.3.2 Número de Diluições.....21

3.7.3.3 Preparo das Diluições na Microplaca.....22

3.7.3.4 Preparo da Suspensão Bacteriana 22

3.7.3.5 Inoculação da Suspensão Bacteriana.....23
3.7.3.6 Leitura das CIMs.....23
3.7.4 Determinação do Tipo SCC*mec* 23
3.7.4.1 Extração do DNA Genômico.....26
3.7.4.2 Reação de amplificação.....26
3.7.4.3 Eletroforese.....27
3.7.4.4 Reação de amplificação.....29
3.7.4.5 Eletroforese.....29
3.7.5 Análise do Polimorfismo do DNA por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....30
3.7.5.1 Digestão Enzimática 31
3.7.5.2 Eletroforese.....32
3.7.5.3 Análise dos Resultados.....32
3.7.6 Pesquisa de Genes de Resistência e Virulência.....33
3.8 Dados de Infecção Nosocomial por MRSA.....33
3.9 Aspectos Éticos 34
3.10 Análise Estatística dos Dados.....34
4 RESULTADOS 37
4.1 Análise dos potenciais fatores associados à colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.....41
4.2 Características Microbiológicas dos Isolados 46
4.3 Teste de Sensibilidade a Vários Antimicrobianos 46
4.4 Pesquisa de Genes de Resistência e Virulência.....47
4.5 Determinação do tipo SCC*mec*.....48
4.6 Análise do Polimorfismo do DNA por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....48
4.7 Resultados de Positividade de Colonização de Funcionários.....50
5 DISCUSSÃO.....52
6 CONCLUSÕES.....58
7 ANEXOS.....60
ANEXO A - Variáveis maternas **60**
ANEXO B - Fichas do recém-nascido.....63

ANEXO C - Orientações para o entrevistador de como preencher o instrumento de coleta de dados 74

ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (mãe) 75

ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (recém-nascido) 77

ANEXO F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (funcionário) 79

ANEXO G - Aprovação da comissão de ética - CAPpesq 81

8 REFERÊNCIAS 83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS	*Staphlylococcus aureus*
MRSA	*Staphlylococcus aureus* resistente à meticilina
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
SCCmec	*Staphylococcal Cassete Chromossome mec*
PBP2A	Proteína Ligante de Penicilina 2A
PBP	Proteínas Ligantes de Penicilina
HA-MRSA	*Staphlylococcus aureus* resistentes à meticilina adquiridos no hospital
CA-MRSA	*Staphlylococcus aureus* resistentes à meticilina provenientes da comunidade
PVL	*Panton Valentine Leucocidin*
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico
NM-MRSA	*Staphlylococcus aureus* resistentes à meticilina não multidroga resistente
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
RN	Recém-nascidos
VM	Ventilação mecânica
CVC	Cateter venoso central
CVP	Cateter venoso periférico
NPT	Nutrição parenteral
ATM	antimicrobianos
LIM54	Laboratório de Investigação Médica 54
BHI	Infusão cérebro e coração
PCR	Cadeia da polimerase

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical Laboratory Standards Institute*
CMHCA	Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado
TBE	Tris-Borato-EDTA
TSB	Soja-tripticaseína
USA	*United States of America*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos primers utilizados para PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec* de acordo com Oliveira e De Lancastre, 2001. 25

Tabela 2 Sequência dos primers utilizados em PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec* de acordo com Zhang, 2005 28

Tabela 3 Caracterização dos recém-nascidos (n=403) - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - fevereiro 2009/janeiro 2010 38

Tabela 4 Caracterização das mães (382) -Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo fevereiro de 2009 - janeiro de 2010.....39

Tabela 5 Distribuição de comorbidades maternas (n=382) Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - fevereiro de 2009 - janeiro de 2010*.....41

Tabela 6 Avaliação dos fatores potencialmente associados à colonização por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) by em recém-nascidos – fevereiro 2009 a janeiro 2010 – Hospital das Clínicas Universidade de São Paulo, Brasil. 43

Tabela 7 Características dos 82 recém-nascidos que permaneceram na unidade neonatal após 72 horas de vida – fevereiro 2009 a janeiro 2010 no HC – FMUSP, Brazil.....44

Tabela 8 Avaliação dos fatores associados à colonização por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) entre recém-nascidos que permaneceram hospitalizados na unidade neonatal após 72 horas devida – fevereiro de 2009 a janeiro de 2010 – HC-FMUSP, Brazil. 45

Tabela 9 Análise multivariada dos fatores potencialmente associados à colonização por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) dos recém-nascidos – fevereiro 2009 a janeiro 2010 – HC-FMUSP, Brazil. 46

Tabela 10 Caracterização do perfil de sensibilidade aos vários antimicrobianos testados nos isolados de *Staphylococcus aureus*.....47

Tabela 11 Positividade de pesquisa *de Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em funcionários realizada em junho e dezembro de 2009. 50

RESUMO

Garcia CP. *Fatores associados à aquisição de Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Na última década, *Staphlylococcus aureus* resistentes à meticilina não multidroga resistente (NM-MRSA) tem sido descrito como um importante agente de infecção de corrente sanguínea em nosso serviço. Este estudo de coorte prospectivo, realizado entre fevereiro de 2009 e janeiro de 2010 na unidade neonatal, avaliou 403 recém-nascidos (RN), suas 382 mães e 148 profissionais da área da saúde (PS). Duzentos e dezessete NB (54%), 187 mães (48%) e 87 PS (59%) foram colonizados por *S. aureus* (SA). A colonização por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi maior entre RN (15%) do que entre mães (4.7%) e PS (3.4%). Embora a transmissão da mãe para seu RN tenha ocorrido, na maior parte dos casos, a mãe não foi a responsável pela colonização do RN. Houve dois padrões predominantes de polimorfismo do DNA por eletroforese em campo pulsado (PFGE) entre os RN, e algumas mães e PS foram colonizados por eles. Fatores estatisticamente associados com colonização por MRSA foram baixo nível de escolaridade materna (fator de risco - OR: 2.99; 95%CI: 1.10-8.07) e rinossinusite materna (fator protetor - OR: 0.33; 95%CI: 0.12-0.88). Entre os Rn que permaneceram hospitalizados mais do que 72 horas, o aleitamento materno foi protetor (OR: 0.22; 95%CI: 0.05-0.98). Todos os isolados foram NM-MRSA, portavam poucos fatores de virulência e *Staphylococcal Cassete Chromossome mec* (SCCmec) tipos IVa e IVd predominaram. Embora não tenham ocorrido casos de infecção, a transmissão nosocomial de MRSA claramente ocorreu na unidade neonatal e aponta para a necessidade de implementação de práticas de controle de infecção, como higienização das mãos para prevenção de infecção cruzada. Outras práticas de promoção à saúde, básicas, mas abrangentes, podem ser fundamentais, como educação e aleitamento materno.

Descritores: *Staphylococcus aureus; Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina; Recém-nascido; Fatores de risco; Unidade de terapia intensiva neonatal; Aleitamento materno; Gravidez; Educação.

ABSTRACT

Garcia CP. *Fatores associados à aquisição de Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

In the last decade non-multiresistant methicillin-resistant *S. aureus* (NM-MRSA) has been described as an important agent in bloodstream infections in our hospital. This prospective cohort study, conducted from February 2009 through January 2010 in the neonatal unit, evaluated 403 newborns (NB), their 382 mothers and 148 health care workers (HCW). 217 NB (54%), 187 mothers (48%) and 87 HCW (59%) were colonized by *S. aureus* (SA). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) colonization was greater among NB (15%) than mothers (4.7%) and HCW (3.4%). Although mother-to-NB transmission occurred, in most cases mothers were not responsible for NB colonization. There were two predominant PGFE patterns among the NB and some mothers and HCW became colonized by them. Factors significantly associated with MRSA carriage by NB were lower level of maternal schooling (risk factor: OR: 2.99; 95%CI: 1.10-8.07) and maternal rhinosinusitis (protective factor: OR: 0.33; 95%CI: 0.12-0.88). Among NB who remained hospitalized for more than 72 hours, breast feeding was protective (OR: 0.22; 95%CI: 0.05-0.98). All the isolates were NM-MRSA, carried few virulence factors and *Staphylococcal Cassete Chromossome mec* (SCC*mec)* types IVa and type IVd predominated. Although there were no cases of infection, nosocomial transmission of MRSA clearly occurred in the neonatal unit and this highlights the need for infection control practices such as hand hygiene to prevent cross-dissemination. Other healthcare practices, which are very basic but also ample in scope, may play a role, such as general education of women and breast feeding.

Descriptors: *Staphylococcus aureus*; Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; Newborn; Risk factors; Intensive care units, neonatal; Breast feeding; Pregnancy; Education.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (SA) é um dos patógenos bacterianos mais importantes para o homem, causando infecções comunitárias e nosocomiais[1].

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) foi, primeiramente, descrito na Europa, em 1960[2], quase que concomitantemente ao surgimento deste antimicrobiano. A partir de então, a proporção de MRSA entre a população de *S. aureus* hospitalares só cresceu, atingindo as marcas de 35,9%, em 1992, e 64,4%, em 2003[3]. No Brasil, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), foram obtidas marcas que variavam de 40 a 70% dos isolados (dados não publicados).

A resistência à meticilina está relacionada a um elemento genético móvel que recebe o nome de cassete cromossômico estafilocóccico, o *SCCmec* (Staphylococcal Cassete Chromossome *mec*)[4]. Este é um fragmento exógeno de DNA, cujo tamanho varia de 15 a 60 kb e que é formado pelos genes *mecA*, *ccrA* e *ccrB*. Os genes *ccrA* e *ccrB* são responsáveis pela mobilidade do gene, e o *mecA* confere resistência aos antimicrobianos β-lactâmicos, por produzir a Proteína Ligante de Penicilina 2A (PBP2A).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos β-lactâmicos consiste na ligação destes às Proteínas Ligantes de Penicilina (PBP), as quais são

responsáveis pela estruturação da rede de peptidoglicanos presente na parede celular, levando à desorganização estrutural dessa. Portanto, a resistência aos β-lactâmicos pode ser dada ou pela hidrólise e consequente inativação da penicilina por meio da produção de penicilinase, presente no gene *bla*, ou pela PBP2A. Essa proteína, produzida pelo gene *mecA*, é uma homóloga da PBP normal, porém possui afinidade muito menor a penicilinas, não ligando-se a essas. Desse modo, mesmo com a PBP normal ligada ao β-lactâmico, a PBP2A permite o crescimento bacteriano até em concentrações mais elevadas do antibiótico, pois continua a exercer a sua função sem sofrer grande interferência desse. É importante ressaltar que a presença da PBP2A fornece resistência a praticamente todos os antibióticos β-lactâmicos, inclusive a meticilina, caracterizando o fenótipo de MRSA[59].

Atualmente, existem descritos onze tipos de *SCCmec*[5], sendo a descrição dos cinco últimos tipos realizada durante o período de realização deste projeto.

Os tipos I, II e III são classicamente relacionados aos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquiridos no hospital[5] (HA-MRSA), tendo maior tamanho e menor mobilidade. O tipo IV tem menor tamanho, maior mobilidade e menor resistência a antibióticos, tendo sido descrito em isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina provenientes da comunidade (CA-MRSA)[6] em ancestrais de MRSA sem ligação aparente com o sistema hospitalar, sendo responsáveis por infecções de pele e tecidos moles em população não ligada ao sistema de saúde. Comumente, são produtores das enterotoxinas B e C, além da Panton Valentine

Leucocidin (PVL), mas não da toxina da síndrome do choque tóxico (*TSST-1*), preservando a susceptibilidade a antibióticos não β-lactâmicos.

Mais recentemente, cepas de MRSA *SCCmec* tipo IV têm sido descritas em pacientes hospitalizados e estão se tornando, também, agentes infecciosos nosocomiais, sendo, então, mais adequadamente designados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina não multidroga resistente (NM-MRSA).

Em um estudo brasileiro feito no HC-FMUSP, em 2005[7], foi observado, de uma amostra de 151 pacientes infectados por MRSA, que 95% deles tinham *SCCmec* tipo IV e que 13% eram suscetíveis a 4 ou mais antibióticos. Apesar de normalmente relacionados ao CAMRSA, esses MRSA *SCCmec* tipo IV são claramente de caráter nosocomial, mesmo apresentando inúmeras semelhanças com o comunitário. Observou-se também, neste estudo, dois focos principais de incidência de infecções por MRSA no Instituto Central do hospital, um na enfermaria da dermatologia, e outro no berçário e Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal.

A caracterização epidemiológica deste foco de elevada incidência na unidade neonatal pretendeu tornar-se útil na proposição de medidas de prevenção e terapêutica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar no Instituto Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2010.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar fatores associados à aquisição de MRSA nesta população;
2. Determinar o perfil de sensibilidade destes isolados;
3. Caracterizar os fatores de virulência destes isolados;
4. Determinar a clonalidade desses isolados.

3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do Estudo

Coorte prospectivo.

3.2 Local, Período e População

Localizado na cidade de São Paulo, o complexo hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) é formado por seis institutos, totalizando, aproximadamente, 2.000 leitos.

A unidade neonatal acolhe recém-nascidos (RN) nascidos no centro obstétrico do Instituto Central do HC-FMUSP provenientes de gestações de alto risco.

Por ocasião da coleta de dados, a unidade neonatal era formada por 65 leitos assim distribuídos: 8 compondo a unidade de cuidados intensivos, 8 identificados como unidade de isolamento, 9 para cuidados de alto risco, 15 para cuidados de médio risco e 25 para baixo risco. Os leitos de isolamento seguiam critérios de admissão pela unidade neonatal, não sendo destinados necessariamente a pacientes com bactérias multirresistentes ou que se enquadrassem nos critérios de isolamento da comissão de controle de

infecção. Os pacientes colonizados por agentes multirresistentes poderiam permanecer em suas respectivas unidades de internação sob precauções de contato.

Nesta época, não havia alojamento conjunto. As mães que não necessitavam de cuidados intensivos, permaneciam internadas em enfermarias, geralmente de 2 leitos, eventualmente em quartos maiores. Durante o período de internação destas mães, no horário de mamadas, os RN internados na área destinada ao baixo risco eram levados até suas respectivas mães em carro coletivo de transporte. Após a alta hospitalar materna, durante o período de permanência dos RN na unidade neonatal, havia horários destinados à visitação e ao aleitamento materno durante todo o dia.

Durante o período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2010 foi realizada uma coorte de RN. Foram incluídos RN que nasceram de segunda, terça, quarta e sexta feira, durante o dia todo e sábados pela manhã. Esta foi uma amostra de oportunidade adequada ao horário de funcionamento do laboratório. Não foram incluídos natimortos. Não houve outros critérios de exclusão. No momento do parto foram coletadas amostras para pesquisa de *S. aureus* em quatro sítios diferentes das mães e de seus recém-nascidos. Os RN foram seguidos na coorte, com coleta de culturas ao longo da internação, até a alta ou óbito hospitalar ou até 28 dias de vida, o que ocorresse antes. Além disso, foram obtidos dados demográficos, da gestação, do parto, clínicos e evolutivos dos RN e de suas mães. O desfecho avaliado foi a colonização do RN por MRSA.

3.3 Desfecho

- O desfecho deste estudo foi colonização por MRSA ao final do seguimento, definida como, pelo menos, uma cultura positiva para MRSA, em qualquer sítio de coleta, sendo considerados os *swabs* propostos para seguimento da coorte e os espécimes coletados pela equipe da unidade para acompanhamento do paciente;

3.4 Variáveis avaliadas

- Sexo: definido como masculino ou feminino (não ocorreu sexo indeterminado);
- Apgar de 1° e 5° minutos: expressos em algarismos arábicos, variando de 0 a 10, segundo escala de Apgar[8], calculado pelo neonatologista;
- Peso ao nascimento: expresso em gramas;
- Característica do líquido amniótico ao nascimento: definido como claro, purulento, hemorrágico ou meconial;
- Idade gestacional ao nascimento: definida a partir dos dados de ecografia precoce durante a gestação, data da última menstruação materna, escala de New Ballard[9] ou Capurro[10] expressa em semanas, calculada pelo neonatologista;
- Gemelaridade: definido como concepto múltiplo;

- Presença de outras comorbidades, definidas pelo médico assistente, posteriormente, classificadas como: síndrome genética, nefropatia, pneumopatia, hepatopatia, imunodeficiência, doença metabólica, doença de depósito, endocrinopatia, doença dermatológica, neuropatia, infecção congênita e cardiopatia;
- Utilização de ventilação mecânica (VM): presença de VM em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definida como utilização ou não utilização;
- Utilização de cateter venoso central (CVC): presença de CVC inserido em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definido como inserção ou não inserção;
- Utilização de cateter venoso periférico (CVP): presença de CVP inserido em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definido como inserção ou não inserção;
- Utilização de drenos: presença de drenos em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento, determinando o tipo de dreno. Definido como utilização ou não utilização;
- Utilização de nutrição parenteral (NPT): presença de NPT em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definida como utilização ou não utilização;
- Utilização de hemoderivados ou hemocomponentes: utilização de produtos derivados do sangue (plasma fresco ou congelado, concentrado de hemácias, plaquetas, albumina) em qualquer

momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definido como utilização ou não utilização;

- Realização de diálise: realização de diálise em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definido como realização ou não realização;
- Procedimento dialítico realizado: nome do procedimento realizado;
- Realização de cirurgias: realização de cirurgias em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definido como realizado ou não realizado;
- Utilização de antimicrobianos (ATM): utilização de ATM em qualquer momento desde o nascimento até o término de seguimento. Definido como utilizado ou não utilizado;
- Tipo de dieta: aleitamento materno exclusivo ou não, utilização de fórmulas lácteas e/ou suplementos alimentares, existência ou ausência de período de jejum;
- Idade da mãe: expressa em anos completos;
- Número de gestações, partos e abortamentos da mãe;
- Escolaridade da mãe: obtida em anos completos;
- Tabagismo materno: Foi considerada tabagista a mãe que informou ser ou ter sido tabagista durante algum período da vida;
- Tabagismo materno durante a gestação: foi considerada tabagista durante a gestação a mãe que informou ter fumado durante a gestação;

- Etilismo materno: considerada etilista a mãe que informou ser, ou ter sido etilista, durante algum período da vida;
- Etilismo materno durante a gestação: considerada etilista durante a gestação a mãe que informou ser etilista durante a gestação;
- Uso de drogas ilícitas, pela mãe, durante a gestação atual: definido por qualquer uso de drogas ilícitas durante a gestação atual segundo informação da mãe;
- Uso prévio de drogas ilícitas, pela mãe: definido como qualquer uso de drogas ilícitas em qualquer momento da vida, antes da gestação atual, segundo informação da mãe;
- Doenças de base da mãe: definidas pelo médico assistente como doenças prévias à internação hospitalar ou referidas pela própria paciente. Foram avaliadas, em especial, as seguintes doenças: diabetes mellitus, diabetes mellitus gestacional, nefropatias, hepatopatias, cardiopatias, doenças reumáticas, neoplasias, doenças hematológicas, infecção por HIV, hipertensão arterial sistêmica, doença hipertensiva específica da gestação, endocrinopatias, asma, doenças neurológicas, doenças reumatológicas, doenças vasculares, doenças psiquiátricas, outros agravos. Definidas como presentes ou ausentes;
- Tempo de rotura de membranas amnióticas: expressa em horas;
- Tipo de parto: definido como cesárea, normal ou fórcipe;
- Anestesia para o parto: geral, bloqueio, local ou não realizada;

- Infecções maternas de pele: segundo informação da própria mãe e do prontuário;
- Realização de acompanhamento pré-natal: foram avaliados o número de consultas realizadas, a data da primeira consulta e o local de realização do acompanhamento;
- Infecções de pele nos residentes na mesma casa da mãe: definida como presente ou ausente, segundo informação da própria mãe;
- Rinossinusite materna crônica: definida como presente ou ausente, segundo informação da própria paciente;
- Colonização maternal por MRSA: definida como presente ou ausente. Este dado foi obtido a partir das culturas para *S. aureus* colhidas da mãe.

3.5 Procedimento de Coleta de Dados

Os dados foram obtidos a partir dos prontuários do recém-nascido e da mãe, e por meio das informações verbais da equipe multidisciplinar de assistência, da mãe e de acompanhantes. Os dados foram registrados em instrumento elaborado especificamente para esta finalidade (Anexos A, B e C).

3.6 Procedimento de Coleta de Material

Foi realizada a coleta de material do recém-nascido, a partir de “swab” perineal, de coto umbilical, de narina anterior e de orofaringe no momento do parto. Esta coleta foi realizada no momento do nascimento, preferencialmente na sala de parto, após estabilização do paciente, ou assim que o RN chegou ao berçário, até 6 horas após o nascimento. A coleta de material da mãe foi realizada por meio de “swab” anal, perineal, de narina anterior e de orofaringe obtidos na sala de parto. Novas coletas do recém-nascido e de suas respectivas mães foram realizadas entre 60 e 72 horas após o nascimento. Nos recém-nascidos que não permanecerem internados após este período, não foram realizadas outras coletas. Para os recém-nascidos que permaneceram internados, foi realizada nova coleta no final de cada semana até o vigésimo oitavo dia de vida ou até alta hospitalar (o que ocorria antes).

As amostras foram colhidas pelo pesquisador executante e por mais sete profissionais da área da Saúde (4 enfermeiras, 2 estudantes de enfermagem e 1 estudante de Medicina) e foram imediatamente encaminhadas para análise pelo Laboratório de Investigação Médica 54 (LIM54) em meio de transporte Stuart.

Os profissionais de saúde (da unidade neonatal, enfermaria da obstetrícia, centro obstétrico, coletores e laboratório) também foram avaliados para colonização, obtendo-se amostras por meio de “swab” nasal

e de orofaringe, na metade e no término do período de estudo. Neste momento foi avaliado se havia presença de lesões cutâneas.

3.7 Métodos Laboratoriais

3.7.1 Métodos Microbiológicos

As coletas foram realizadas com “swabs” estéreis e armazenadas em meio de transporte Stuart até a sua entrega no laboratório para análise no mesmo dia da coleta[11].

Os “swabs” foram adicionados ao meio líquido: caldo infusão cérebro e coração (BHI), e incubados a 37ºC, por 24 horas, para enriquecimento da amostra, e, então, semeados em ágar sal-manitol e incubados a 35°C por até 48 horas. *Staphylococcus aureus* fermentam manitol formando colônias de características sugestivas deste microrganismo[12].

Após o período de incubação, as colônias características foram repicadas, e isoladas em ágar-sangue de carneiro e incubadas a 35ºC por 24 horas. As colônias características obtidas em ágar sangue foram submetidas à coloração de Gram, e aos testes de catalase e DNAse para identificação fenotípica presuntiva[13]. O controle de qualidade foi realizado utilizando-se a cepa ATCC® 29213.

Os isolados de *Staphylococcus aureus* identificados foram submetidos ao teste de triagem para detecção de resistência a oxacilina em ágar

Mueller-Hinton contendo 4% de cloreto de sódio e 6 mg/L de oxacilina[12]. O controle de qualidade foi realizado utilizando-se as cepas ATCC® 29213 (sensível) e NCTC® 10442 (resistente).

Os isolados positivos, tanto resistentes quanto sensíveis a oxacilina foram identificados e guardados no banco de cepas a -80ºC em meio Caldo BHI acrescido de 10% de glicerol.

As cepas consideradas *S. aureus* pelos testes fenotípicos de triagem foram submetidas à confirmação por detecção do gene da coagulase, que confirma a identificação de *S. aureus* e o gene *mecA,* que confirma a resistência a betalactâmicos, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.7.2 Detecção do Gene *mec*A e do Gene da Coagulase

Para a detecção dos gene *mec*A, foi utilizado um conjunto de *primers* para PCR multiplex, sintetizados pela Invitrogen[14] como se segue: SA-1 (5’ CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA 3’) e SA-2 (5’ CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT 3’), SA-3 (5’ GTA GAT TGG GCA ATT ACA TTT TGG AGG 3’) e SA-4 (5’ CGC ATC AGC TTT GTT ATC CCA TGT A 3’), e um DNA molde para controle interno de reação. Os *primers* SA-1 e SA-2 são responsáveis pela amplificação de uma região de 214bp do gene *mec*A, enquanto SA-3 e SA-4, por uma região conservada de 117bp do gene da coagulase. Desse modo, pode se obter a diferenciação simultânea entre *S.*

aureus (coagulase positiva) e estafilococos coagulase negativa. O DNA utilizado para controle interno de reação é coamplificado com os *primers* SA-1 e SA-2, formando um produto de amplificação de 150bp, detectando resultados falso-negativos.

3.7.2.1 Extração do DNA Genômico

Para a extração do DNA genômico, foi utilizada a técnica de fervura, adaptada de Kearnes, 1999[14]. Foi adicionado a cada amostra um mix de extração contendo EDTA 0,1M, Tris HCl 1M (pH 7,5), lisostafina (Invitrogen) 20000 U/mL e água livre de nucleases. As amostras foram cultivadas em ágar sangue por 24h a 35º ±2º C e, após o período de incubação, uma alçada foi transferida para 100 µl do mix de extração, em eppendorf de 1,5mL. A extração foi realizada em dois intervalos de temperatura: 30 min a 37º C e 10 min a 100º C. Aguardou-se o resfriamento e foram adicionados 900 µl de água livre de nucleases a cada amostra.

As amostras foram, assim, agitadas em vortex, centrifugadas por 10 min a 13000rpm, o sobrenadante foi, então, aspirado e congelado a -20º C até o momento de uso.

3.7.2.2 Reação de Amplificação

Para a reação de amplificação, foi preparada uma mistura de reação contendo Tris-HCl 10mM (pH8,8), $MgCl_2$ 4mM, KCl 50mM, 0,1% de Triton X-100, 200µM de cada dNTP, 25pmol de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. Subsequentemente, foram adicionados 1µl da amostra a 49µl da mistura de reação. A reação de amplificação foi realizada no termociclador PTC200 (MJ Research), utilizando o seguinte programa: 1min 94°C, seguido por 15 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 68°C e 30s a 72°C. Após, mais 20 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C. E mais uma extensão adicional de 2min a 72°C[14]. Após, os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese. Como controles positivo e negativo para a amplificação do fragmento de 214bp do gene *mec*A, foram utilizados os DNAs extraídos das cepas de *S. aureus* NCTC10442[15] e *S. aureus* ATCC29213, respectivamente. Como controles positivo e negativo para a amplificação do fragmento de 117bp do gene da coagulase, foram utilizados os DNAs extraídos das cepas de *S. aureus* NCTC10442 e *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente. Em todas as reações, foi utilizada como controle negativo água destilada deionizada estéril.

3.7.2.3 Eletroforese

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 1 hora e 30minutos a 110V. Como padrão de peso molecular, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen). O DNA foi corado com SYBR Safe® “DNA gel stain” (Invitrogen), e, posteriormente, visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

3.7.3 Determinação do Espectro de Resistência a Agentes Antimicrobianos

Foi avaliado o perfil de sensibilidade de um isolado MRSA de cada paciente para os seguintes agentes antimicrobianos: oxacilina, cefoxitina, penicilina G, rifampicina, eritromicina, clindamicina, vancomicina, ciprofloxacino, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol e cotrimoxazol.

Os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de microdiluição em caldo para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para os diferentes antimicrobianos, conforme Tabela 1 do CLSI (Documento M100-S19; *Clinical Laboratory Standards Institute*, 2009). A cepa ATCC® 29213 foi utilizada como controle para o teste, conforme Tabela 2C do CLSI 2009[16].

3.7.3.1 Preparo da Solução Estoque do Antimicrobiano

A solução estoque de antimicrobiano foi preparada a uma concentração final de 10mg/mL. Para cada antimicrobiano, foi empregado o solvente adequado, conforme os procedimentos padronizados pelo CLSI (documento M100-S19, 2009)[16]. Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\textbf{Peso (mg)} = \frac{\textbf{Volume (mL) X Concentração (}\mu\textbf{g/mL)}}{\textbf{Potência (}\mu\textbf{g/mg)}}$$

3.7.3.2 Número de Diluições

As concentrações testadas abrangeram os cortes descritos na tabela 2C do documento M100-S19 (para uso com M7-A8, CIM) do CLSI[17], de 0,125μg/mL a 256μg/mL. A solução inicial de 256μg/mL foi obtida a partir da solução estoque de concentração igual a 10.000μg/mL. Foram realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado para cada antimicrobiano (Tabela 5 do documento M100-S19, CLSI, 2009)[16].

3.7.3.3 Preparo das Diluições na Microplaca

Um volume de 50μL de meio de cultura CMHCA (Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado) foi aplicado em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1. Foi acrescentado 100μL da diluição a 256μg/mL em todos os poços da coluna 1. Com uma pipeta multicanal, foi realizada diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50μL do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). A mistura foi bem homogeneizada e, em seguida, foi pipetado 50μL do poço A2 para o A3. Este procedimento foi realizado até o poço A11, tendo este um volume final de 100μL, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A_{12}-H_{12}) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, foram inoculados 50μL de meio de cultura MHCA mais 50μL da suspensão bacteriana (diluída 1:100)[15].

3.7.3.4 Preparo da Suspensão Bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland (~1,5 x 10^8 UFC/mL) por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm. Esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ou caldo MHCA (~1,5 x 10^6UFC/mL)[15].

3.7.3.5 Inoculação da Suspensão Bacteriana

Foi adicionado 50μL da suspensão bacteriana diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). Após o preparo das diluições, a inoculação foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos. Após semeadura, as placas foram homogeneizadas por movimento rotatório e colocadas em saco plástico estéril. As placas foram incubadas a 35ºC por 16 a 20 horas em atmosfera ambiente[16].

3.7.3.6 Leitura das CIMs

A leitura foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos poços da microplaca por dois pesquisadores e por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 625nm. Os resultados foram interpretados de acordo com o documento M100-S19[16].

3.7.4 Determinação do Tipo de SCC*mec*

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada em duas etapas, utilizando-se dois métodos de PCR multiplex. Primeiramente, foi realizada a

determinação do tipo de SCC*mec* conforme descrito por Oliveira & De Lencastre[18]. Foram utilizados 8 loci (A-H), apresentados na Tabela 1, selecionados com base nas sequências do elemento *mec* descritas previamente[19-21]. O locus A está localizado *downstream* ao gene *pls* e é específico para o SCC*mec* tipo I; o locus B é um fragmento interno do operon *kdp*, que é específico para o SCC*mec* tipo II; o locus C é um fragmento interno do gene *mecI* presente nos SCC*mec* tipos II e III; o locus D é um fragmento interno da região *dcs*, presente nos SCC*mec* tipos I, II e IV; o locus E está localizado na região entre o plasmídeo pI258 e o transposon Tn*554*, sendo específico para o SCC*mec* tipo III; o locus F, também específico para o SCC*mec* tipo III, está localizado entre o Tn*554* e a junção cromossômica direita (*orfX*). Os loci G e H foram incluídos para distinguir as variantes estruturais IA e IIIA, respectivamente. O locus G corresponde à junção esquerda entre a sequência de inserção IS*431* e o plasmídeo pUB110; o locus H corresponde à junção esquerda entre a sequência de inserção IS*431* e o plasmídeo pT181.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados para PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec* de acordo com Oliveira e De Lancastre, 2001.

Locus	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Localização	Tamanho do Amplicon	Especificidade (tipo de SCCmec)
A	CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	18398–18419a 18892–18871ª	495	I
B	KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	10445–10467b 10728–10707b	284	II
C	MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACTTGTC	42428–42447b 42636–42617b	209	II, III
D	DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	38011–37992a 37670–37689ª	342	I, II, IV
E	RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	45587–45607c 45829–45809c	243	III
F	RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	59573–59594c 59986–59965c	414	III
G	IS431 P4 pUB110 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	49963–49982b 50343–50323b	381	
H	IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	29654–29673c 29976–29956c	303	
Meca	MECA P4 MECA P7	TCCAGATTACAACTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	1190–1211d 1351–1332d	162	Controle interno

3.7.4.1 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada por meio da técnica de fervura[14] como descrita anteriormente neste trabalho.

3.7.4.2 Reação de amplificação

Para a reação de amplificação, foi utilizada a seguinte mistura de reação: tampão de reação da Taq 1x, 200µM de cada dNTP, 400nM dos primers CIF2 F2, CIF2 R2, MCEI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 F13, pUB110 R1 e pT181, 800nM dos primers DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7 e IS431 P4, 200nM dos primers KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 e RIF4 R9, 1,25U de AmpliTaq e, aproximadamente, 20ng do DNA molde. A reação de amplificação foi realizada utilizando o seguinte programa: 4min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94ºC, 30s a 53ºC e 1min a 72ºC. E mais uma extensão adicional de 4min a 72ºC. Após, os tubos foram mantidos a 4ºC até o momento da eletroforese[18].

Como controles positivos para os diferentes tipos de SCCmec, foram utilizadas as seguintes cepas de MRSA: NCTC 10442 (SCCmec tipo I), N315 (SCCmec tipo II), 85/2082 (SCCmec tipo III) (comunicação pessoal da Dra. Teruyo Ito, Universidade de Juntendo, Japão) e JSC 1968 (SCCmec tipo IV)[22]. Como controle negativo, foi utilizada água destilada deionizada estéril.

3.7.4.3 Eletroforese

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 1h a 110V. Como padrão de peso molecular, foi utilizado um marcador 100bp (*Invitrogen Carlsbad*, Califórnia). O DNA foi corado com SYBR Safe® "*DNA gel stain*" (*Invitrogen Carlsbad*, Califórnia) e, posteriormente, visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Os isolados não tipáveis, cuja identificação do tipo de SCCmec não foi possível por meio do protocolo de Oliveira e Delancastre, foram submetidos a uma segunda reação de PCR multiplex, descrita por Zhang[23], capaz de identificar um número maior de variações do SCCmec, utilizando os primers descritos na tabela 2. De acordo com o protocolo de PCR multiplex de Zhang[23], os isolados foram classificados como SCC*mec* tipo I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd ou V de acordo com o perfil de bandas apresentados.

Tabela 2 – Sequência dos primers utilizados em PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec* de acordo com Zhang, 2005

Primer	Sequencia de oligonucleotídeos (5'-3')	Conc. (µM)	Tamanho do amplicon (pb)	Especificidade (tipo de SCCmec)
Type I-F Type I-R	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	0.048	613	SCC*mec* I
Type II-F Type II-R	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	0.032	398	SCC*mec* II
Type III-F Type III-R	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	0.04	280	SCC*mec* III
Type IVa-F Type IVa-R	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	0.104	776	SCC*mec* IVa
Type IVb-F Type IVb-R	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	0.092	493	SCC*mec* IVb
Type IVc-F Type IVc-R	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	0.078	200	SCC*mec* IVc
Type IVd-F5 Type IVd-R6	CTCAAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	0.28	881	SCC*mec* IVd
Type V-F Type V-R	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	0.06	325	SCC*mec* V
MecA147-F MecA147-R	GTGAAGATATACCAAGTGATT ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	0.046	147	*mecA*
mecI-F mecI-R	CCCTTTTTATACAATCTCGTT ATATCATCTGCAGAATGGG	0.08	146	Class A m*ec*
IS1272-F mecR1-R	TATTTTTGGGTTTCACTCGG CTCCACGTTAATTCCATTAATACC	0.08	1,305	Class B *mec*
ccrAB-β2 ccrAB-α2 ccrAB-α3 ccrAB-α4	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT AACCTATATCATCAATCAGTACGT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	0.08 0.08 0.08 0.08	700 1,000 1,600	Type 1 *ccr* Type 2 *ccr* Type 3 *ccr*
ccrC-F ccrC-R	ATGAATTCAAAGAGCATGGC GATTTAGAATTGTCGTGATTGC	0.08	336	Type 5 *ccr*

3.7.4.4 Reação de amplificação

Para esta reação, foram utilizados os DNAs previamente extraídos que estavam armazenados a -20ºC.

Para a reação de amplificação, foi utilizada a seguinte mistura de reação: reagente de reação 2X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix® (*Life Technologies Corporation*, Carlsbad, Califórnia) e 200nM dos *primers* Tipo I-F, Tipo I-R, Tipo II-F, Tipo II-R, Tipo III-F, Tipo III-R, Tipo IVa-F, Tipo IVa-R, Tipo IVb-F, Tipo IVb-R, Tipo IVc-F, Tipo IVc-R, Tipo IVd-F, Tipo VId-R, Tipo V-F, Tipo V-R, mecA147-F, mecA 147-R, mecI-F, mecI-R, IS1272-F, mecR1-R, ccrAB-β2, ccrAB-α2, ccrAB-α3, ccrAB-α4, ccrC-F e ccrC-R e água livre de nucleases.

Como controle positivos, foram utilizadas as cepas controle padrão MRSA para tipagem de SCC*mec*: tipo I (NCTC10442), tipo II (N315), tipo III (85/2082), tipo IVa (CA05), tipo IVb (8/6-3P), tipo IVc (MR108), tipo IVd (JCSC4469), e tipo V (WIS [WBG8318]-JCSC3624).

3.7.4.5 Eletroforese

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 1h a 110V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador 100bp (*Invitrogen Carlsbad*, Califórnia). O DNA foi corado com SYBR Safe® "*DNA gel stain*"

(*Invitrogen Carlsbad*, Califórnia) e, posteriormente, visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

3.7.5 Análise do Polimorfismo do DNA por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

As cepas de *Staphylococcus aureus* foram semeadas em ágar-sangue de carneiro a 5% (AS) e incubadas a 35°C durante 24 horas. Posteriormente, foram repicadas em caldo de soja-tripticaseína (TSB) e incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3.345ˣg durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1ml de solução salina estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga previamente pesado. Essa suspensão foi centrifugada a 23.100ˣg durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, o sedimento foi ressuspenso com 1ml de solução salina estéril, centrifugado a 23.100ˣg durante 15 minutos e, novamente, descartado o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi, então, pesado e ressuspenso em EDTA 50mM pH8,0, para uma concentração final de 100µg de massa bacteriana por µl. Desta suspensão, 15µl foram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 215µl de tampão EC, adicionado de 250µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20µl de solução de lisostafina (100µg/ml) (Sigma, USA). Esta suspensão foi transferida para os moldes nos quais permaneceu por 30 minutos a 4°C, para solidificação dos blocos. Após esta etapa, os blocos foram transferidos

para uma placa de cultura de células de 24 orifícios, contendo 2ml de tampão EC em cada orifício e incubadas a 37°C por um período de cinco horas, sob agitação suave. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5ml de tampão CHEF TE, e, a seguir, incubados com 1ml de tampão ES adicionado de 50µl de solução de proteinase K (20mg/ml) (Invitrogen, USA) por uma noite à temperatura de 50°C. Os blocos foram, então, lavados com 2,5ml de tampão CHEF TE (quatro lavagens com incubações de uma hora cada) e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese[24].

3.7.5.1 Digestão Enzimática

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® *Sma*I (CCC^GGG) (*Fermentas Life Sciences*, Canadá), que reconhece e cliva sequências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Staphylococcus aureus* (12 a 20 sítios de restrição)[25,26]. Para o tratamento com enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 orifícios contendo 300µl de tampão DNS. A seguir, o tampão DNS foi retirado e, novamente, foram adicionados 300µl de tampão DNS, o bloco foi incubado a temperatura ambiente durante uma hora. Este processo foi repetido quatro vezes. Após este período, o tampão DNS foi substituído por 100µl de uma solução contendo tampão FastDigest® 1x e 1µl da enzima

FastDigest® *Sma*I. Em seguida, os blocos foram incubados por 6 minutos a 37°C.

3.7.5.2 Eletroforese

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, usa) em 0,5x TBE (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [*Amersham Pharmacia Biotech*, USA])[58], no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 5 a 60 segundos por 23 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm[24].

Após, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio (Sigma, USA) e fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFG (*New England Biolabs*, Inc., USA), com extensão das bandas de 48,5Kb até 1,0Mb[24].

3.7.5.3 Análise dos Resultados

Para as diferentes categorias de isolados de MRSA, foi avaliado se existem padrões de sensibilidade a antimicrobianos característicos, linhagens predominantes e tipos de SCC*mec*.

Os perfis de DNA gerados por PFGE foram, inicialmente, analisados visualmente e agrupados. Foram utilizados os critérios de interpretação conforme descrito previamente[27].

Os perfis de DNA gerados pela PFGE, que possuíam sete ou mais bandas de diferença, foram considerados tipos distintos. Foi atribuída uma letra para cada tipo. Para diferenciar os subtipos (perfis de DNA com seis ou menos bandas distintas), foram designados números à respectiva letra.

3.7.6 Pesquisa de Genes de Resistência e Virulência

Foi realizada pesquisa para os genes de virulência.das leucocidinas LukDE e Panton Valentine, toxina choque tóxico, esfoliatina A e B, clumping factor B, proteína ligadora de fibrinogênio e proteína ligadora de fibronectina por PCR multiplex em 33 amostras[60]. Estas 33 amostras representaram recém-nascidos em todos os meses do estudo e em todos os períodos de permanência no hospital, profissionais da saúde e mães.

3.8 Dados de Infecção Nosocomial por MRSA

Durante todo o seguimento, os RN foram avaliados quanto à ocorrência de infecção hospitalar[28] por MRSA.

3.9 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 0751/08 (Anexo G). Dentre as variáveis avaliadas, foi estudada a colonização materna e dos profissionais de saúde, portanto, a mãe assinou um termo de consentimento a respeito dos procedimentos aos quais ela e o recém-nascido (RN) seriam submetidos após apresentação e esclarecimento desses (Anexos D e E). Os profissionais de saúde também assinaram termo específico de consentimento (Anexo F).

3.10 Análise Estatística dos Dados

Os dados laboratoriais foram, primeiramente, armazenados em planilha EXCEL e, posteriormente, digitados em um banco de dados computadorizado, utilizando o *software* Epi data (*The Epi data*, Odense, Denmark).

As variáveis epidemiológicas foram, primeiro, armazenadas nos instrumentos de coleta, em papel, e, após, digitadas em um banco de dados computadorizado, utilizando o *software* Epi data (*The Epi data*, Odense, Denmark).

A análise dos dados foi realizada utilizando-se SPSS *statistical software*, versão 19.0 (SPSS, Chicago, IL), com descrição das

características populacionais, apresentando-se a frequência para variáveis categóricas; e média, desvio-padrão, mediana e intervalo para variáveis contínuas. Os pacientes colonizados por MRSA foram comparados aos não colonizados. Esta análise foi realizada para a população inteira e para a subpopulação que permaneceu internada após 72 horas do nascimento. O risco relativo e o seu intervalo de confiança de 95% foram determinados para as variáveis dicotômicas, sendo consideradas significativamente associadas à colonização por MRSA se o intervalo de confiança não incluísse 1,0. Significância estatística também foi avaliada utilizando-se o teste de qui-quadrado ou teste de Fisher, sendo a associação estatística considerada para valores de $p < 0,05$. As variáveis contínuas foram transformadas em dicotômicas. As variáveis que apresentaram $p \leq 0,20$ foram incluídas na análise multivariada, por regressão logística múltipla, realizada com o programa EpiInfo 2000 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA). As variáveis foram consideradas significativamente associadas ao desfecho se o intervalo de confiança de 95% do Odds Ratio não incluísse 1,0.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Durante o período de estudo, 5699 swabs foram coletados de 403 recém-nascidos, 1784 de suas 382 respectivas mães e 442 de 148 profissionais da saúde.

Durante o período de seguimento, 217 RN (53,8%) apresentaram colonização por *Staphylococcus aureus* em algum momento do acompanhamento. No momento do parto, 187 mães (48%) eram colonizadas por SA. Entre os PS, 87 (59%) eram colonizados por SA. A proporção de portadores de MRSA foi de 15% (59/403) entre os RN, 4,7% (18/382) entre as mães e 3,4% (5/148) entre os PS. As características dos RN e de suas mães podem ser vistas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Na primeira coleta, 46 recém-nascidos (11%) já apresentavam colonização por *Staphylococcus aureus*, sendo apenas um deles colonizado por MRSA.

Entre os RN que receberam alta até o terceiro dia, o tempo médio para colonização por *Staphylococcus aureus* foi de 2,6 dias. O tempo médio para colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina foi de 3,6 dias. Entre os RN que permaneceram internados mais de 72 horas, o tempo de colonização por SA foi de 3,9 dias e por MRSA de 6,8 dias.

A população avaliada não apresentou infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Entre os 403 recém-nascidos avaliados, 23 (5,7%) apresentaram comorbidades, sendo que 12 apresentaram síndrome genética (3%) e 10, cardiopatia (2%); dois (0,5%), nefropatia; dois (0,5%), metabolopatia; e um (0,25%), pneumopatia. Alguns RN apresentaram mais de uma comorbidade.

As características da população estudada estão descritas nas tabelas 3, 4 e 5 a seguir.

Tabela 3 - Caracterização dos recém-nascidos (n=403) - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Fevereiro de 2009 a janeiro de 2010.

	Número	**Percentual**
Sexo masculino	200	49,6%
Gemelaridade	43	10,7%
Peso ao nascimento (gramas)		
< 750	2	0,5%
750-999	4	1,0%
1000-1499	10	2,5%
1500-1999	9	2,2%
2000-2499	64	15,9%
≥ 2500	314	77,9%
Idade gestacional ao nascimento (semanas)		
< 28	3	0,7%
28 – 33 6/7	18	4,5%
34 – 36 6/7	65	16,1%
≥ 37	317	78,7%
Apgar de primeiro minuto ≤ 3	6	1,5%
Apgar de quinto minuto <6	4	1,0%
Presença de comorbidades	23	5,7%
Utilização de cateter venoso central	34	8,4%
Utilização de ventilação mecânica invasiva	21	5,2%
Utilização de ventilação mecânica não invasiva	20	5,0%
Utilização de nutrição parenteral	31	7,7%
Utilização de Dreno	4	1,0%
Utilização de cateter venoso periférico	58	14,3%
Submetido à diálise	6	1,5%
Submetido à cirurgia	16	4,0%
Utilização de hemocomponente/hemoderivado	9	2,2%
Submetido à realização de glicemia capilar	191	47,4%
Utilização de antimicrobianos	47	11,7%
Alta ao terceiro dia	321	79,7%

Tabela 4 - Caracterização das mães (382) - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Fevereiro de 2009 a janeiro de 2010.

	Média	**Mediana**	**Desvio-padrão**	**(Mínimo – Máximo)**
Idade (anos)	30,5	30,3	6,8	(14.5 – 48.3)
Escolaridade (anos)	9,9	11,0	3,0	(0 - 16)
Número de gestações (inclui a atual)	2,7	2,0	1,6	(0 - 9)
Paridade anterior	1,3	1,0	1,3	(0 - 7)
Número de abortos prévios	0,4	0,0	0,8	(0 - 5)
Tempo de internação antes do parto (dias)	3,2	0,0	7,	(0 - 51)
Número de pessoas residentes no domicílio materno	3,1	3,0	1,4	(1 - 11)
Pré-natal				
Número de consultas	9,2	9,0	3,8	(0 - 23)
Idade gestacional no início do pré-natal (semanas)	14,1	12,9	7,1	(0 - 36,6)
			n	**%**
Local da realização de pré-natal				
HC			288	75,4
Outro local			60	15,7
HC e outro local			31	8,1
Não fez			3	0,8
Tabagismo			88	23
Fumou durante a gestação			41	10,7
Etilismo			4	1,0
Uso de álcool durante a gestação			0	0,0
Usuária de drogas ilícitas			4	1,0

Continua

Continuação

	n	%
Uso de drogas ilícitas durante gestação	1	0,3
Presença de comorbidade materna	289	75,7
Soropositividade para HIV	7	1,8
Tempo rotura membranas		
Zero	242	63,4
≤ 18 horas	116	30,3
>18 horas	24	6,3
Líquido amniótico		
Claro	375	93,0
Meconial	26	6,5
Hemorrágico	2	0,5
Tipo de parto		
Cesárea	282	74,0
Normal	78	20,5
Fórcipe	21	5,5
Tipo de anestesia		
Geral	11	2,9
Bloqueio	360	94,3
Local	4	1,0
Não recebeu	7	1,8
Afecções de pele maternas	20	5,2
Afecções de pele nos residentes no domicílio	33	8,6
Rinossinusite materna	73	19,1
Cirurgia materna no último ano	6	1,6

Tabela 5 - Distribuição de comorbidades maternas (n=382) - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Fevereiro de 2009 a janeiro de 2010*.

	n	%
Hipertensão arterial sistêmica	90	23,6%
Doença hipertensiva específica da gestação	57	14,9%
Diabetes mellitus gestacional	48	12,6%
Cardiopatia	37	9,7%
Doença Hematológica	34	8,9%
Endocrinopatia	33	8,6%
Diabetes mellitus	25	6,5%
Doença Reumatológica	22	5,8%
Doença Neurológica	16	4,2%
Asma	15	3,9%
Doença Psiquiátrica	15	3,9%
Nefropatia	12	3,1%
Vascular	8	2,1%
Hepatopatia	8	2,1%
Neoplasia	7	1,8%
Outras	44	11,5%

* A somatória ultrapassa 100% pois houve, em alguns casos, mais de uma comorbidade por mãe avaliada.

4.1 Análise dos potenciais fatores associados à colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

A análise de potenciais fatores associados à colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina está apresentada na Tabela 6.

Apresentou associação estatística para colonização por MRSA: escolaridade materna até 4 anos. A presença de rinossinusite materna apresentou associação estatística para proteção de colonização por MRSA. Estes fatores permaneceram significativamente associados à colonização por MRSA na análise multivariada (Tabela 9).

Tabela 6 - Avaliação dos fatores potencialmente associados à colonização por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em recém-nascidos – fevereiro 2009 a janeiro 2010 – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

	RN colonizado MRSA N: 59	**RN não colonizados MRSA N: 344**	**Risco relativo**	**Intervalo de confiança de 95%**	**p**
Sexo masculino	33	167	1.29	0.80-2.07	0.30
Gemelaridade	5	38	0.78	0.33-1.83	0.55
Peso ao nascimento < 2000 g	3	22	0.81	0.27-2.41	1.00
Idade gestacional ao nascimento < 37 semanas	12	74	0.94	0.52-1.69	0.84
Apgar 1º minuto ≤ 3 pontos	0	6	-	-	0.60
Apgar 5º minuto < 6 pontos	0	4	-	-	1.00
Aleitamento materno	54	321	0.81	0.35-1.85	0.58
Submetido à glicemia capilar	31	160	1.23	0.77-1.97	0.39
Parto vaginal	12	87	0.76	0.42-1.38	0.36
Presença de comorbidades	3	20	0.88	0.30-2.61	1.00
Uso de ventilação mecânica invasiva	2	19	0.64	0.17-2.44	0.75
Uso de ventilação mecânica não invasiva	2	18	0.67	0.18-2.56	0.75
Uso de cateter venoso periférico	5	53	0.55	0.23-1.32	0.16
Uso de cateter venoso central	2	30	0.41	0.10-1.59	0.20
Uso de nutrição parenteral	3	28	0.64	0.21-1.94	0.60
Submetido a procedimento cirúrgico	2	14	0.85	0.23-3.17	1.00
Submetido à diálise	0	4	-	-	1.00
Uso de drenos	1	3	1.72	0.31-9.55	0.47
Uso de antimicrobianos	5	42	0.70	0.30-1.66	0.41
Presença de comorbidades maternas	41	248	0.83	0.49-1.40	0.48
Tabagismo materno	12	76	0.89	0.49-1.61	0.70
Etilismo materno	1	3	1.69	0.30-9.37	0.48
Uso de drogas ilícitas pela mãe	1	3	1.69	0.30-9.37	0.48
Escolaridade materna ≤ 4 anos	7	14	2.45	1.27-4.72	0.02
Mãe submetida a cirurgia no último ano	0	6	-	-	0.60
Afecção de pele materna	4	16	1.37	0.55-3.40	0.52
Afecção de pele nos membros da família	5	28	1.02	0.44-2.37	1.00
Hospitalização materna > 30 dias antes do parto	3	4	2.97	1.22-7.23	0.07
Alta até 72 horas após o nascimento	49	272	1.25	0.66-2.36	0.48
Transfusão sanguínea	2	4	2.32	0.73-7.38	0.21
Rinossinusite materna	5	68	0.41	0.17-0.98	0.03
Líquido amniótico não claro	2	26	0.47	0.12-1.83	0.40
Ruptura de membranas amnióticas ≥ 18 horas	3	21	0.83	0.28-2.46	1.00
Mais de três residentes no domicílio	20	101	1.19	0.72-1.96	0.51
Mãe colonizada por MRSA	3	15	1.15	0.40-3.31	0.74

Até o terceiro dia de vida, 80% dos RN receberam alta hospitalar. As características dos RN remanescentes na unidade estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características dos 82 recém-nascidos que permaneceram na unidade neonatal após 72 horas de vida – fevereiro 2009 a janeiro 2010. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

	N	**Proporção (%)**
Sexo masculino	44	53.7
Gemelaridade	13	15.9
Peso de nascimento (g)		
< 750	2	0.5
750-999	4	1.0
1000-1499	10	12.2
1500-1999	9	11.0
2000-2499	21	25.6
≥ 2500	36	43.9
Idade gestacional ao nascimento (semanas)		
< 28	3	3.5
28-33 6/7	18	22.0
34-36 6/7	27	33.0
≥ 37	34	41.5
Presença de comorbidades	16	19.5
Uso de cateter venoso periférico	50	61.0
Uso de cateter venoso central	34	41.5
Uso de nutrição parenteral	30	36.6
Uso de ventilação mecânica invasiva	21	25.6
Uso de ventilação mecânica não invasiva	19	23.2
Submetido a procedimento cirúrgico	15	18.3
Submetido à diálise	6	7.3
Uso de drenos	4	4.9
Uso de antimicrobianos	46	56.1
Aleitamento materno	60	73.2

Na análise bivariada, não houve fator associado a colonização por MRSA estatisticamente significativo entre os RN que permaneceram internados por mais de 72 horas (Tabela 8). Na análise multivariada (Tabela

9), aleitamento materno apresentou associação estatística com efeito protetor contra colonização por MRSA.

Tabela 8 - Avaliação dos fatores associados à colonização por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) entre recém-nascidos que permaneceram hospitalizados na unidade neonatal após 72 horas devida – fevereiro de 2009 a janeiro de 2010 - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

	Recém-nascidos colonizados por MRSA N: 10	**Recém-nascidos não colonizados por MRSA N: 72**	**Risco Relativo**	**Intervalo de confiança**	**P**
Sexo masculino	8	36	3.46	0.78-15.29	0.10
Gemelaridade	2	11	1.33	0.32-5.55	0.66
Peso de nascimento < 2000 g	3	22	0.98	0.28-3.47	1.00
Idade gestacional ao nascimento < 37 semanas	6	42	1.06	0.32-3.48	1.00
Apgar 1º minuto ≤ 3 pontos	0	5	-	-	1.00
Apgar 5º minuto < 6 pontos	0	4	-	-	1.00
Aleitamento materno	5	55	0.37	0.12-1.15	0.12
Submetido à glicemia capilar	7	56	0.70	0.20-2.46	0.69
Parto vaginal	3	14	1.46	0.42-5.05	0.69
Presença de comorbidades	2	14	1.03	0.24-4.40	1.00
Uso de ventilação mecânica invasiva	2	18	0.78	0.18-3.36	1.00
Uso de ventilação mecânica não invasiva	2	18	0.83	0.19-3.58	1.00
Uso de cateter venoso periférico	5	45	0.640	0.20-2.04	0.50
Uso de cateter venoso central	2	30	0.39	0.09-1.72	0.30
Uso de nutrição parenteral	3	27	0.74	0.21-2.66	0.74
Submetido a procedimento cirúrgico	2	13	1.12	0.26-4.74	1.00
Submetido à diálise	0	4	-	-	1.00
Uso de drenos	1	3	2.17	0.36-13.18	0.41
Uso de antimicrobianos	5	41	0.78	0.25-2.50	0.74
Presença de comorbidades maternas	5	50	0.36	0.12-1.12	0.17
Tabagismo materno	4	22	1.26	0.39-4.06	0.73
Etilismo materno	0	0	-	-	-
Uso de drogas ilícitas pela mãe	1	1	4.06	0.89-18.45	0.25
Escolaridade materna ≤ 4 anos	0	3	-	-	1.00
Mãe submetida a cirurgia no último ano	0	1	-	-	1.00
Afecção de pele materna	1	2	2.67	0.48-14.79	0.35
Afecção de pele nos membros da família	0	4	-	-	1.00
Rinossinusite materna	1	12	0.53	0.07-3.83	1.00
Hospitalização materna > 30 dias antes do parto	1	1	4.00	0.88-18.19	0.25
Mais de três residentes no domicílio	3	21	0.89	0.25-3.15	1.00
Mãe colonizada por MRSA	0	2	-	-	1.00

Tabela 9 - Análise multivariada dos fatores associados à colonização por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) dos recém-nascidos – fevereiro 2009 a janeiro 2010 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

Fator	Odds ratio	IC 95%	P
Todos os recém-nascidos (n: 403)			
Escolaridade materna ≤ 4 anos	2.99	1.10-8.07	0.03
Rinossinusite materna	0.33	0.12-0.88	0.03
Hospitalização materna > 30 dias antes do parto	4.05	0.82-20.05	0.09
Recém-nascidos que permaneceram > 72 horas internados (n: 82)			
Aleitamento materno	0.22	0.05-0.98	0.047
Hospitalização materna > 30 dias antes do parto	7.59	0.39-149.04	0.18
Sexo masculine	4.14	0.75-22.77	0.10

IC: intervalo de confiança

4.2 Características Microbiológicas dos Isolados

Dois dos isolados foram identificados como MSSA na identificação fenotípica e apresentaram o gene *mec*A, e foram resistentes a cefoxitina na determinação da CIM por microdiluição em caldo. De acordo com as orientações do CLSI 2009, eles foram reclassificados como MRSA.

4.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Foram realizados os testes de sensibilidade em 122 amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Caracterização do perfil de sensibilidade aos vários antimicrobianos testados para isolados de *Staphylococcus aureus.*

Antimicrobiano	Sensibilidade	Sensibilidade Intermediária	Resistência
Cloranfenicol	74%	25%	1%
Ciprofloxacina	98%	0%	2%
Gentamicina	98%	0%	2%
Penicilina	0%	0%	100%
Clindamicina	99%	0%	1%
Vancomicina	100%	0%	0%
Eritromicina	34%	0%	64%
Tetraciclina	98%	1%	1%
Rifampicina	100%	0%	0%
Oxacilina	2%	0%	98%*
Cefoxitina	0%	0%	100%*
Sulfametoxazol-trimetropim	99%	0%	1%

*Observação: todos os isolados testados apresentaram o gene *mec*A e foram resistentes a cefoxitina, conforme critérios interpretativos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Dois destes isolados foram considerados sensíveis à oxacilina pelo padrão de interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) apresentado.

4.4 Pesquisa de Genes de Resistência e Virulência

Todas as amostras foram positivas para LuKde, clumping factor B e proteína ligadora de fibronectina, e negativas para os demais genes testados: Panton Valentine, toxina choque tóxico, esfoliatina A e B e proteína ligadora de fibrinogênio .

4.5 Determinação do tipo de SCC*mec*

Entre a população neonatal, 58% dos isolados de MRSA evidenciaram SCCmec IV (56% tipo IVa e 2% - apenas 1 amostra – tipo IVd). Não foi possível determinar o tipo do SCCmec em 42% dos isolados a despeito da ampliação de possibilidades de tipagem pelos dois métodos utilizados. Entre as mães, 74% dos isolados apresentaram SCCmec tipo IVa. Os demais foram não tipáveis. Entre os PS, 40% apresentou SCCmec IVa e os demais foram não tipáveis.

4.6 Análise do Polimorfismo do DNA por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Durante o período de estudo, foram descritos 16 diferentes padrões de PFGE, sendo que 11 (69%) destes padrões ocorreram entre os RN. A Figura 1 mostra a distribuição ao longo do tempo destes padrões de PFGE descritos entre os RN. Diferentes padrões se alternaram durante o tempo, apesar de existirem dois padrões predominantes: padrão 2 (28%) e 5 (30%).

Somente quatro RN colonizados por MRSA (7%) tinham uma mãe MRSA colonizada no momento do parto. Dois destes RN apresentavam padrão de PFGE idêntico às suas mães (padrão 1 - descrito apenas para este par durante todo o estudo – e padrão 3). Um dos pares, foi perdido para análise e o último par apresentou diferentes padrões de PFGE diferentes

entre a mãe e o RN (padrões 2 e 4). Nenhum destes pacientes permaneceu na unidade neonatal após 72 horas de vida.

Três mães, não colonizadas por MRSA no momento do parto, tornaram-se colonizadas no terceiro dia. Uma destas mães apresentou colonização simultaneamente ao seu RN (PFGE padrão 2, um dos predominantes na unidade). As outras se tornaram colonizadas pelo padrão de PFGE predominante entre os RN naquele momento na unidade (padrões 2 e 5).

Um par de gêmeos, colonizado por MRSA, filhos de uma mãe não colonizada, também apresentou padrão 2 de PFGE durante o seguimento, o padrão predominante na unidade naquele momento.

Entre as mães, foram descritos 11 padrões de PFGE, não houve um padrão predominante. Os padrões 6, 7 e 13 foram descritos apenas entre as mães no momento do parto.

Cinco profissionais da saúde apresentaram colonização por MRSA. Apesar de três destes profissionais apresentarem culturas positivas em ambas as coletas, apenas um apresentou o mesmo padrão PFGE (padrão 9) em ambas ocasiões. O segundo PS apresentou o mesmo padrão de PFGE (padrão 15, descrito apenas entre os PS) em ambas ocasiões, mas também apresentou, simultaneamente, um segundo padrão de PFGE (padrão 16) na segunda coleta. O terceiro PS era colonizado por MRSA PFGE padrão 16 (um padrão descrito apenas entre os PS) na primeira coleta e passou a apresentar PFGE padrão 2 (um dos dois padrões de PFGE que predominavam entre os RN) na segunda coleta.

4.7 Resultados de Positividade de Colonização de Funcionários

Apenas 5 funcionários do Berçário foram positivos para MRSA, conforme dados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Positividade de pesquisa *de Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em funcionários realizada em junho e dezembro de 2009.

	Funcionários avaliados	**Funcionários colonizados**	**Positividade de funcionários**
Laboratório	6	0	0%
Centro-obstétrico	11	0	0%
Obstetrícia	25	0	0%
Berçário	106	5	4,7%
Total	148	5	3,4%

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os recém-nascidos foram colonizados por MRSA (15%) em maior proporção do que suas mães (4,7%) e que os PS (3,4%). Todos isolados de MRSA eram não multidroga resistente (NM-MRSA). Apesar da transmissão da mãe para o RN haver ocorrido, ela não foi comum e, na maioria das vezes, a colonização do RN não ocorreu a partir de sua mãe. Houve dois padrões predominantes de PGFE (padrões 2 e 5) entre os RN e algumas mães, e PS foram também colonizados por cepas de MRSA destes padrões de PFGE. No entanto, houve padrões de PFGE descritos apenas entre mães ou entre PS. Fatores significativamente associados com colonização de recém-nascidos por MRSA foram baixa escolaridade materna (fator de risco) e rinossinusite materna (fator protetor). Considerando apenas os RN que permaneceram internados mais de 72 horas na unidade neonatal, o aleitamento materno foi protetor.

Utilizando tipagem molecular, observamos a circulação de dois clones predominantes de MRSA (padrões de PFGE 2 e 5) entre os RN. Em, pelo menos, uma ocasião, um PS que era previamente colonizado por MRSA padrão 16 (descrito apenas entre os PS) tornou-se colonizado por MRSA padrão 2 (que era predominante entre os RN). Em duas outras ocasiões, PS e RN tornaram-se colonizados por MRSA com mesmo padrão (padrões 9 e 10) e não foi possível inferir quem se colonizou primeiro. Provavelmente,

estes clones predominantes circularam entre ambas as populações na unidade.

Na literatura médica, a transmissão de MRSA da mãe para seu RN foi bem documentada[35-37], mas parece não apresentar um importante papel na colonização do RN por MRSA[38-41]. Nossos resultados foram consistentes com estes achados. Verificamos que a colonização materna não foi estatisticamente significativa como fator de risco para aquisição de MRSA pelos RN e transmissão materna de MRSA da mãe para seu RN foi claramente demonstrada em apenas 2 casos. Por outro lado, três mães foram colonizadas por cepas provavelmente adquiridas na unidade, sendo a fonte, possivelmente, seu próprio RN.

Entre os 11 diferentes padrões descritos entre os RN, verificamos uma distribuição temporal: diferentes clones de MRSA predominaram durante curtos períodos na unidade (Figura 1), sugerindo que pequenos surtos de MRSA ocorreram ao longo do tempo. Os dois padrões de PFGE predominantes (padrões 2 e 5) retornaram depois de meses de ausência na unidade (Figura 1), sugerindo que haja um reservatório desconhecido que não pôde ser determinado.

Por décadas, o clone de MRSA predominante em ambientes hospitalares foi o multirresistente clone endêmico brasileiro[42,43]. Nos últimos 10 anos, NM-MRSA – portador de SCC*mec* tipo IV – tem sido descrito como um importante agente de infecções de corrente sanguínea em nossa instituição[44]. Mais recentemente, documentamos o aparecimento do MRSA – portador de SCC*mec* tipo II[46]. No presente estudo, todos isolados de MRSA

na unidade neonatal foram NM-MRSA e, apesar de haver uma grande proporção de isolados não tipáveis, SCC*mec* tipo IVa e d, predominaram.

Nenhum dos fatores de risco habitualmente associados à colonização por MRSA[29-34], como: gravidade patologia de base, cuidados clínicos intensivos, terapêutica antimicrobiana, utilização de cateter venoso central, baixo peso ao nascimento, permanência hospitalar prolongada, baixa idade gestacional, gestações múltiplas, cuidados tipo canguru, parto vaginal, tabagismo materno e intubação endotraqueal foram identificados neste estudo.

Outro estudo realizado em nossa instituição também não identificou estes fatores, “chamados clássicos”, em associação com infecções de corrente sanguínea causadas por NM-MRSA[45]. No entanto, no presente estudo, escolaridade materna baixa, até quarto anos, foi fator de risco para colonização por MRSA e rinossinusite materna foi protetor. Entre os recém-nascidos que permaneceram internados por mais de 72 horas, o aleitamento materno foi protetor.

Consideramos que aleitamento materno como fator protetor pode ser explicado pela imunidade humoral. A resposta humoral a *S. aureus*[48,52] e as propriedades anti-infecciosas do leite humano[47,51] são bem conhecidas. O aleitamento materno como fator protetor contra colonização por *S. aureus* foi descrito previamente[54] entre crianças de 2 a 60 meses. Verificamos estes mesmos achados agora entre recém-nascidos. Rinossinusite como fator protetor pode também ser decorrente de resposta humoral. Níveis significativamente elevados de imunoglobulinas alérgeno-específicas de

todas as subclasses foram previamente descritos na rinite alérgica[53]. Por outro lado, a transmissão de MRSA pelo leite humano já foi descrita[49,50], podendo ser decorrência de contaminação do leite. As propriedades protetoras do leite humano aplicam-se à colonização por MRSA, mas o aleitamento materno pode ser fonte de infecção por MRSA em certos casos, principalmente em casos de contaminação.

Como único fator de risco para colonização por MRSA entre RN, identificamos baixa escolaridade materna. Menos de quarto anos de educação formal é realmente muito pouco em termos de proposta educacional e, muito provavelmente, pode estar relacionada a hábitos precários de higiene. Higiene precária está relacionada à colonização por MRSA[55,56]. Entretanto, não avaliamos esta questão. Encontramos uma descrição[57] correlacionando baixa escolaridade materna e colonização por MRSA, porém, após a análise bivariada, este fator não permaneceu estatisticamente associado. Este achado pode sugerir que é possível se obter redução da colonização por MRSA com ampliação da educação materna.

Outro achado interessante no presente estudo foi a não ocorrência de infecções por MRSA. A ausência de fatores de virulência nos isolados pode explicar estes achados.

Consideramos como principais limitações deste estudo a não avaliação de hábitos de higiene, de superlotação ou de falta de pessoal, fatores que poderiam estar relacionados aos achados e elucidar alguns pontos obscuros. A colonização dos PS foi avaliada em apenas dois momentos e

não durante todo o seguimento. A despeito da utilização de dois métodos de tipagem molecular, não foi possível determinar o tipo de SCC*mec* em grande parte dos isolados de MRSA.

Em resumo, apesar de não haver casos de infecção, a transmissão nosocomial de MRSA foi clara dentro da unidade neonatal, e sinaliza a necessidade de implementação de práticas assistenciais e de controle de infecção relacionada à assistência que, apesar de básicas, são de difícil implantação, como higienização das mãos. Sinaliza também que medidas mais amplas e de abrangência para toda a sociedade podem ter impacto: como a educação materna e o aleitamento materno.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Fatores significantemente associados com colonização por MRSA foram baixa escolaridade maternal (fator de risco) e rinossinusite materna (fator protetor). Entre os RN que permaneceram internados mais de 72 horas na unidade neonatal, aleitamento materno foi protetor.

Todos isolados de MRSA eram não multidroga resistente (NM-MRSA).

Todas as amostras foram positivas para LuKde, *clumping factor* B e proteína ligadora de fibronectina, e negativas para Panton Valentine Leucocidin, toxina choque tóxico, esfoliatina A e B, e proteína ligadora de fibrinogênio.

SCC*mec* tipo IV predominou.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

ANEXO A – Variáveis maternas.

Variáveis maternas

Código

Nome:

RG: Cole a etiqueta

Data de Nascimento: / /

Pulseira

Participação na pesquisa: 1-aceitou 2-recusou

A Data de internação: / /

B Data do parto: / /

C Procedência 1-Internação eletiva 2-Ambulatório 3-Pronto Socorro 4-Outra especificar:

D Escolaridade (em anos)

E Número de gestações

F Número de partos

G Número de abortamentos

H Tempo de bolsa rota (em horas)

I Tipo de parto: 1-normal 2-cesárea 3-fórcipe

J Anestesia: 1-geral 2-raqui 3-pendural 4-local

L Duração do trabalho de parto (em horas)

L1 Antes da internação

L2 Depois da internação

M Cardiotocografia: 1-sim 2-não

N Número de toques durante trabalho de parto

O Fez pré-natal: 1-HC 2-outro local 3-não fez

P Número de consultas de pré-natal realizadas

Q Idade gestacional na 1º consulta

Outras comorbidades 1-sim 2-não

R Profilaxia antimicrobiana Explicitar qual:

S Uso de corticosteróides Explicitar qual:

T Hepatopatia Explicitar qual:

U Cardiopatia Explicitar qual:

V Neoplasia Explicitar qual:

1-sim 2-não

W Doença reumatológica Explicitar qual: _____ W ☐

X Nefropatia Explicitar qual: _____ X ☐

Y Infecções de pele Explicitar qual: _____ Y ☐

Z Sintomas respiratórios (atuais) Explicitar Qual: _____ Z ☐

AA Febre atual AA ☐

AB Sorologia positiva para HIV AB ☐

AC AIDS AC ☐

AD Anemia falciforme AD ☐

AE Esplenectomia AE ☐

AF Hipertensão arterial sistêmica AF ☐

AG DHEG AG ☐

AH Pneumonia AH ☐

AI Infecção urinária durante a gestação AI ☐

AJ Infecção urinária adequadamente tratada AJ ☐

AK Colonização por *estreptococo do grupo B* (SGB ou *S. agalactiae*) AK ☐

AL Profilaxia para SGB adequada AL ☐

AM Rino-sinusite crônica AM ☐

AN Diabetes mellitus AN ☐

AO Outras Explicitar qual: _____ AO ☐

AP Infecções de pele nos residentes no mesmo domicílio Explicitar qual: _____ AP ☐

AQ Nº de pessoas que moram no domicílio _____ AQ ☐

AR Tabagismo Quantificar: _____ AR ☐

AS Fumou durante a gestação? Quantificar: _____ AS ☐

AT Consumo de álcool? Quantificar: _____ AT ☐

AU Consumo de álcool durante a gestação Quantificar: _____ AU ☐

AV Uso de drogas injetáveis Explicitar qual: _____ AV ☐

AW Uso de drogas injetáveis durante a gestação Explicitar qual: _____ AW ☐

AX Uso atual de antimicrobianos Explicitar qual: _____ AX ☐

AY Uso prévio de antimicrobianos Explicitar qual: _____ AY ☐

Variáveis Maternas

Código

Nome:

RG: Cole a etiqueta

Data de Nascimento: / /

Pulseira

1-sim
2-não

3° dia

CA Gripe CA
CB Febre CB
CC Rino-sinusite CC
CD Antimicrobianos Explicitar qual: CD

1ª semana

CA Gripe CA
CB Febre CB
CC Rino-sinusite CC
CD Antimicrobianos Explicitar qual: CD

2ª semana

CA Gripe CA
CB Febre CB
CC Rino-sinusite CC
CD Antimicrobianos Explicitar qual: CD

3ª semana

CA Gripe CA
CB Febre CB
CC Rino-sinusite CC
CD Antimicrobianos Explicitar qual: CD

4ª semana

CA Gripe CA
CB Febre CB
CC Rino-sinusite CC
CD Antimicrobianos Explicitar qual: CD

ANEXO B – Fichas do recém-nascido.

Ficha do Recém-nascido

Dia do parto

Código

Nome: _____

RG: _____ Cole a etiqueta

Data de Nascimento: ____/____/____ Pulseira _____

A Sexo:	1-masculino 2-feminino	3-indeterminado	A
B Peso ao nascimento (em gramas):			B
C Idade gestacional ao nascimentos (em semanas):			C
D Líquido amniótico:	1-claro 2-hemorrágico	3-purulento 4-meconial	D
E Apgar 1º minuto:			E
F Apgar 5º minuto:			F
G Sindrome de aspiração meconial:		1-sim 2-não	G
H Score de gravidade			H
I Gemelidade:		1-sim 2-não	I

Na sala de parto

J Procedimentos de reanimação neonatal	1-sim 2-não	J
K Procedimento de intubação traqueal	1-sim 2-não	K
L Administração de medicação endovenosa	1-sim 2-não	L
M Utilização de ventilação com pressão positiva	1-sim 2-não	M
N Cateterização umbilical	1-sim 2-não	N
N1 N.º de tentativas em veia:		N1
N2 N.º de tentativas em artéria:		N2

Ficha do Recém-nascido

3º dia

Código

Nome: Cole a etiqueta

RG: _____ Pulseira _____

	Outras comorbidades	Explicitar qual:		1-sim 2-não
AA	Síndromes genéticas		AA	
AB	Nefropatia		AB	
AC	Pneumonia		AC	
AD	Hepatopatia		AD	
AE	Alterações imunológicas		AE	
AF	Doenças metabólicas		AF	
AG	Doenças de depósito		AG	
AH	Cardiopatia		AH	
AI	Uso de corticosteróides		AI	
AJ	Hemodevirados/Hemocomponentes		AJ	
AK	Icterícia		AK	
AK	Temperatura máxima		AK	
AL	Temperatura mínima		AL	
AM	Ventilação mecânica invasiva		1-sim 2-não AM	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AN Ventilação mecânica não invasiva — 1-sim 2-não AN

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AO Cateter venoso central — 1-sim 2-não AO

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AP Dextro

AO1 Número de dextros — AO1

AO2 Dextro máximo — AO2

AO3 Dextro mínimo — AO3

AQ Drenos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AP

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AR Acesso periférico (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AR

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AS Nutrição parenteral (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AS

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AT Antimicrobianos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AT

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AU Cirurgias (explicitar procedimentos) — 1-sim 2-não — AU

	Data do procedimento
	/ /
	/ /
	/ /
	/ /

AV Diálise peritoneal — 1-sim 2-não — AV

Data de início	Data de término
/ /	/ /
/ /	/ /
/ /	/ /
/ /	/ /

AX Dieta (Explicitar se seio materno, leite materno ofertado ou fórmula. Se fórmula indicar qual) — 1-sim 2-não — AX

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

Ficha do Recém-nascido

1ª semana

Código

Nome: Cole a etiqueta

RG:

Pulseira

	Outras comorbidades	Explicitar qual:		1-sim 2-não
AA	Síndromes genéticas		AA	
AB	Nefropatia		AB	
AC	Pneumonia		AC	
AD	Hepatopatia		AD	
AE	Alterações imunológicas		AE	
AF	Doenças metabólicas		AF	
AG	Doenças de depósito		AG	
AH	Cardiopatia		AH	
AI	Uso de corticosteróides		AI	
AJ	Hemodevirados/Hemocomponentes		AJ	
AK	Icterícia		AK	
AK	Temperatura máxima		AK	
AL	Temperatura mínima		AL	
AM	Ventilação mecânica invasiva		1-sim 2-não AM	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AN	Ventilação mecânica não invasiva	1-sim 2-não AN	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AO	Cateter venoso central	1-sim 2-não AO	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

Ficha do Recém-nascido

1ª semana

Código

Nome: Cole a etiqueta

RG:

Pulseira

	Outras comorbidades	Explicitar qual:		1-sim 2-não
AA	Síndromes genéticas		AA	
AB	Nefropatia		AB	
AC	Pneumonia		AC	
AD	Hepatopatia		AD	
AE	Alterações imunológicas		AE	
AF	Doenças metabólicas		AF	
AG	Doenças de depósito		AG	
AH	Cardiopatia		AH	
AI	Uso de corticosteróides		AI	
AJ	Hemodevirados/Hemocomponentes		AJ	
AK	Icterícia		AK	
AK	Temperatura máxima		AK	
AL	Temperatura mínima		AL	
AM	Ventilação mecânica invasiva		1-sim 2-não AM	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AN Ventilação mecânica não invasiva — 1-sim 2-não AN

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AO Cateter venoso central — 1-sim 2-não AO

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

Ficha do Recém-nascido

2ª semana

Código

Nome: Cole a etiqueta

RG:

Pulseira

	Outras comorbidades	Explicitar qual:		1-sim 2-não
AA	Síndromes genéticas		AA	
AB	Nefropatia		AB	
AC	Pneumonia		AC	
AD	Hepatopatia		AD	
AE	Alterações imunológicas		AE	
AF	Doenças metabólicas		AF	
AG	Doenças de depósito		AG	
AH	Cardiopatia		AH	
AI	Uso de corticosteróides		AI	
AJ	Hemodevirados/Hemocomponentes		AJ	
AK	Icterícia		AK	
AK	Temperatura máxima		AK	
AL	Temperatura mínima		AL	
AM	Ventilação mecânica invasiva		1-sim 2-não AM	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AN Ventilação mecânica não invasiva — 1-sim 2-não AN

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AO Cateter venoso central — 1-sim 2-não AO

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AP Dextro

AO1 Número de dextros — AO1

AO2 Dextro máximo — AO2

AO3 Dextro mínimo — AO3

AQ Drenos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AP

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AR Acesso periférico (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AR

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AS Nutrição parenteral (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AS

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AT Antimicrobianos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AT

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AU Cirurgias (explicitar procedimentos) — 1-sim 2-não — AU

	Data do procedimento
	/ /
	/ /
	/ /
	/ /

AV Diálise peritoneal — 1-sim 2-não — AV

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AX Dieta (Explicitar se seio materno, leite materno ofertado ou fórmula. Se fórmula indicar qual) — 1-sim 2-não — AX

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

Ficha do Recém-nascido

3ª semana

Código

Nome: Cole a etiqueta

RG:

Pulseira

	Outras comorbidades	Explicitar qual:		1-sim 2-não
AA	Síndromes genéticas		AA	
AB	Nefropatia		AB	
AC	Pneumonia		AC	
AD	Hepatopatia		AD	
AE	Alterações imunológicas		AE	
AF	Doenças metabólicas		AF	
AG	Doenças de depósito		AG	
AH	Cardiopatia		AH	
AI	Uso de corticosteróides		AI	
AJ	Hemodevirados/Hemocomponentes		AJ	
AK	Icterícia		AK	
AK	Temperatura máxima		AK	
AL	Temperatura mínima		AL	
AM	Ventilação mecânica invasiva		1-sim 2-não AM	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AN	Ventilação mecânica não invasiva	1-sim 2-não AN	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AO	Cateter venoso central	1-sim 2-não AO	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AP Dextro

AO1 Número de dextros — AO1

AO2 Dextro máximo — AO2

AO3 Dextro mínimo — AO3

AQ Drenos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AP

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AR Acesso periférico (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AR

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AS Nutrição parenteral (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AS

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AT Antimicrobianos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AT

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AU Cirurgias (explicitar procedimentos) — 1-sim 2-não — AU

	Data do procedimento
	/ /
	/ /
	/ /
	/ /

AV Diálise peritoneal — 1-sim 2-não — AV

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AX Dieta (Explicitar se seio materno, leite materno ofertado ou fórmula. Se fórmula indicar qual) — 1-sim 2-não — AX

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

Ficha do Recém-nascido

4ª semana

Código

Nome: Cole a etiqueta

RG:

Pulseira

	Outras comorbidades	Explicitar qual:		1-sim 2-não
AA	Síndromes genéticas		AA	
AB	Nefropatia		AB	
AC	Pneumonia		AC	
AD	Hepatopatia		AD	
AE	Alterações imunológicas		AE	
AF	Doenças metabólicas		AF	
AG	Doenças de depósito		AG	
AH	Cardiopatia		AH	
AI	Uso de corticosteróides		AI	
AJ	Hemodevirados/Hemocomponentes		AJ	
AK	Icterícia		AK	
AK	Temperatura máxima		AK	
AL	Temperatura mínima		AL	
AM	Ventilação mecânica invasiva		1-sim 2-não AM	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AN	Ventilação mecânica não invasiva	1-sim 2-não AN	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AO	Cateter venoso central	1-sim 2-não AO	

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AP Dextro

AO1 Número de dextros — AO1

AO2 Dextro máximo — AO2

AO3 Dextro mínimo — AO3

AQ Drenos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AP

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AR Acesso periférico (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AR

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AS Nutrição parenteral (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AS

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AT Antimicrobianos (explicitar qual) — 1-sim 2-não — AT

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AU Cirurgias (explicitar procedimentos) — 1-sim 2-não — AU

	Data do procedimento
	/ /
	/ /
	/ /
	/ /

AV Diálise peritoneal — 1-sim 2-não — AV

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

AX Dieta (Explicitar se seio materno, leite materno ofertado ou fórmula. Se fórmula indicar qual) — 1-sim 2-não — AX

	Data de início	Data de término
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /
	/ /	/ /

ANEXO C – Orientações para o entrevistador de como preencher o instrumento de Coleta de Dados.

COMO PREENCHER O INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

ORIENTAÇÕES PARA O ENTREVISTADOR

- Antes de iniciar a coleta de dados, o entrevistador deve ler todo o instrumento de coleta e ter, às mãos, uma caneta, para registro das respostas. Deve, também, ler os termos de consentimento de mãe e recém-nascido. O entrevistador deve esclarecer, com o pesquisador principal, eventuais dúvidas relacionadas ao conteúdo dos formulários.

1. Ao chegar ao local de coleta, o entrevistador deve preencher os campos relacionados à identificação da paciente (mãe), no instrumento para coleta de dados. Com os dados de identificação preenchidos, o entrevistador deve dirigir-se à paciente (mãe) e apresentar-se. Deve explicar, com clareza e em linguagem adequada à compreensão da mesma, o projeto de pesquisa.

2. Após estes esclarecimentos, deve perguntar se a mesma concorda em participar da pesquisa, bem como consente que o recém-nascido participe. O entrevistador deve então completar o campo referente à participação na pesquisa.

a. Caso a paciente (mãe) recuse-se a participar da pesquisa ou recuse a participação do recém-nascido, o entrevistador deve preencher o campo como recusa e arquivar a ficha.
b. Caso haja concordância sobre a participação da mãe e do recém-nascido, o entrevistador deve preencher o campo como aceitação, ler os termos de consentimento da mãe do recém-nascido, junto com a paciente, e solicitar à mãe que assine os dois termos. O entrevistador deve, também, assinar os dois termos de consentimento.

3. O entrevistador inicia, então, o preenchimento do instrumento de coleta propriamente dito.

4. O instrumento deve ser completamente preenchido (todos os campos) através de entrevista com a mãe, consulta ao prontuário da paciente e entrevistas com a equipe multi-disciplinar.

5. O entrevistador deve estar atento às unidades de medida referidas em cada campo (exemplo: dias, horas, gramas, etc).

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (mãe).

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

mãe

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar.

PESQUISADOR : Anna Sarah S. Levin

CARGO/FUNÇÃO: . Docente FMUSP.. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº -SP 47966

UNIDADE DO HCFMUSP Grupo de Controle de Infecção Hospitalar:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Desde que nascemos o nosso corpo já é alvo de vários microorganismos, que buscam em nós, uma moradia. Nesse estudo, nós procuramos verificar uma possível existência de uma bactéria, *Staphylococcus aureus*, em você e/ou em seu(sua) filho(a). Essa bactéria pode ser encontrada em nosso corpo e não necessariamente causar doenças, mas, em situações em que as defesas do nosso corpo estão diminuídas, podem levar ao adoecimento.

Para procurarmos essa bactéria, será solicitada a você a coleta de material com uso de swabs, são um tipo de cotonete, que serão aplicados no fundo da sua boca, nariz, vagina, ânus e pele entre os dois. Também será solicitada a coleta de material de seu filho(a), com uso de swabs que serão aplicados no nariz, no fundo da boca, na pele e ânus e no resto do cordão umbilical. Um profissional treinado (médico, enfermeiro) fará esta coleta, que é indolor e não levará riscos para você e nem para o bebê. Esta coleta será repetida, dependendo da permanência de vocês no hospital e dos retornos em ambulatório.

O resultado desse estudo não beneficiará diretamente a você nem ao seu filho, mas ajudará a compreender como essa bactéria age e o que nós podemos fazer para impedir que ela cause doenças.

Caso você decida não participar deste estudo, não haverá qualquer prejuízo no seu atendimento, já que o mesmo tipo de assistência com a mesma equipe e com o mesmo grau de atenção será dada a você e ao seu bebê.

Caso aceite participar deste estudo, você poderá suspender sua participação em qualquer momento, sem modificação/comprometimento na assistência médica.

O sigilo será garantido e você não terá seu nome divulgado em qualquer publicação. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Anna Sarah S. Levin que poderá ser encontrada no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 6º andar Telefone(s) 3069-7066. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar". Eu discuti com o Dr. Anna Sarah S. Levin sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, em mim e meu filho(a), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (recém-nascido).

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Recém-nascido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar.

PESQUISADOR : Anna Sarah S. Levin

CARGO/FUNÇÃO: . Docente FMUSP.. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº -SP 47966

UNIDADE DO HCFMUSP Grupo de Controle de Infecção Hospitalar:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Desde que nascemos o nosso corpo já é alvo de vários microorganismos, que buscam em nós, uma moradia. Nesse estudo, nós procuramos verificar uma possível existência de uma bactéria, *Staphylococcus aureus*, em você e/ou em seu(sua) filho(a). Essa bactéria pode ser encontrada em nosso corpo e não necessariamente causar doenças, mas, em situações em que as defesas do nosso corpo estão diminuídas, podem levar ao adoecimento.

Para procurarmos essa bactéria, será solicitada a você a coleta de material com uso de swabs, são um tipo de cotonete, que serão aplicados no fundo da sua boca, nariz, vagina, ânus e pele entre os dois. Também será solicitada a coleta de material de seu filho(a), com uso de swabs que serão aplicados no nariz, no fundo da boca, na pele e ânus e no resto do cordão umbilical. Um profissional treinado (médico, enfermeiro) fará esta coleta, que é indolor e não levará riscos para você e nem para o bebê. Esta coleta será repetida, dependendo da permanência de vocês no hospital e dos retornos em ambulatório.

O resultado desse estudo não beneficiará diretamente a você nem ao seu filho, mas ajudará a compreender como essa bactéria age e o que nós podemos fazer para impedir que ela cause doenças.

Caso você decida não participar deste estudo, não haverá qualquer prejuízo no seu atendimento, já que o mesmo tipo de assistência com a mesma equipe e com o mesmo grau de atenção será dada a você e ao seu bebê.

Caso aceite participar deste estudo, você poderá suspender sua participação em qualquer momento, sem modificação/comprometimento na assistência médica.

O sigilo será garantido e você não terá seu nome divulgado em qualquer publicação. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Anna Sarah S. Levin que poderá ser encontrada no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 6º andar Telefone(s) 3069-7066. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar". Eu discuti com o Dr. Anna Sarah S. Levin sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, em mim e meu filho(a), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (funcionário).

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
funcionário

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar.

PESQUISADOR : Anna Sarah S. Levin

CARGO/FUNÇÃO: . Docente FMUSP.. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº -SP 47966

UNIDADE DO HCFMUSP Grupo de Controle de Infecção Hospitalar:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Desde que nascemos o nosso corpo já é alvo de vários microorganismos. Nesse estudo, nós procuramos verificar uma possível existência de uma bactéria, *Staphylococcus aureus*, em recém-nascidos de parto hospitalar. Essa bactéria pode ser encontrada em nosso corpo e não necessariamente causar doenças, mas, em situações em que as defesas do nosso corpo estão diminuídas, podem levar ao adoecimento.

Para procurarmos essa bactéria, será solicitada a você a coleta de material com uso de swabs, são um tipo de cotonete, que serão aplicados no seu nariz ou em eventuais lesões de pele. Um profissional treinado (médico, enfermeiro) fará esta coleta, que é indolor e não levará riscos para você. Esta coleta poderá será repetida.

O resultado desse estudo não beneficiará diretamente a você, mas ajudará a compreender como essa bactéria age e o que nós podemos fazer para impedir que ela cause doenças.

Lembramos que pessoas saudáveis podem ser normalmente colonizadas por esta bactéria, mas como queremos compreender o comportamento desta bactéria na unidade em que você trabalha, procuraremos identificá-la no seu corpo.

Caso você decida não participar deste estudo, não haverá qualquer prejuízo para você.

Caso aceite participar deste estudo, você poderá suspender sua participação em qualquer momento.

O sigilo será garantido e você não terá seu nome divulgado em qualquer publicação. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Anna Sarah S. Levin que poderá ser encontrada no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 6º andar Telefone(s) 3069-7066. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Fatores associados à aquisição de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) em recém-nascidos de parto hospitalar". Eu discuti com o Dr. Anna Sarah S. Levin sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, em mim, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO G – Aprovação da Comissão de Ética - CAPpesq.

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/09/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0751/08**, intitulado: "**FATORES ASSOCIADOS À AQUISIÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE À OXACILINA (MRSA) EM RECÉM-NASCIDOS DE PARTO HOSPITALAR**" apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Anna Sara S. Levin**
Pesquisador (a) Executante: **Cilmara Polido Garcia**

CAPPesq, 25 de Setembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med*. 1998;339:520-32.

2. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:180-9.

3. Klevens RM, Jonathan RE, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R; National Nosocomial Infections Surveillance System. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis.* 2006;42:389-91.

4. Kikuch K. Genetics basis of neonatal methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. *Pediatr Int*. 2003;45:223-9.

5. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011;60:95-103.

6. Kluytmans-VandenBergh MFQ, Kluytmans JAJW. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: current perspectives clinical microbiology and infection. 2006;12(suppl 1):9-15.

7. Trindade PA, Pacheco RP, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS. Prevalence of SCC*mec* type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3435-7.

8. American College of Obstetricians and Gynecologists and Committee on Obstetric Practice, American Academy of Pediatrics, Committee on Fetus and Newborn. The Apgar Score. *Pediatrics*. 2006;117:1444-7.

9. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatrics.* 1991;119:417-23.

10. Capurro H, Korichzky S, Fonseca O, Caldeiro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestacional age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1978;93:120-2.

11. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed., American Society for Microbiology. 1999.

12. Singh K, Gavin PJ, Vescio T, Thomson Jr RB, Deddish RB, Fisher A, Noskin GA, Peterson LR. Microbiologic surveillance using nasal cultures alone is sufficient for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates in neonates. *J Clin Microbiol*. 2003;4:2755-7.

13. Mir N, Sánchez M, Baquero F, López B, Calderón C, Cantón R. Soft salt-mannitol agar-cloxacillin test: a highly specific bedside screening test for detection of colonization with methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 1998;36:986-9.

14. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. *J. Hosp Infect.* 1999;43:33-7.

15. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. New class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin-resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1549-55.

16. Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Nineteenth Edition. Informational Supplement. CLSI document M100-S19, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

17. Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. Eighth Edition. Document M07-A8. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

18. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2155-61.

19. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1449-58.

20. Ito T, Katayama Y, Asada N, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1323-36.

21. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microb Drug Resist*. 2001;7:349-61.

22. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1147-52.

23. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol.* 2005;43:5026-33.

24. Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. Molecular biology PFGE analysis of chromosomal restriction fragments. In: Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, ASM Press. 1992.

25. Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA fingerprint by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates*. J Clin Microbiol.* 1992;30:967-73.

26. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant Staphylococcus aureus screening, surveillance and typing: state of the art an unmet needs. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:112-9.

27. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.

28. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control.* 1988;16:128-40.

29. Pujol M, Peña C, Pallares R, Ayats j, Ariza J, Gudiol F. Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:96-102.

30. Villari P, Iacuzio L, Torre I, Scarcella A. Molecular epidemiology as na effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. *J Infect*. 1998;37(3):274-81.

31. Kuint J, Barzilai A, Regev-Yochay G, Rubinstein E, Keller N, Maayan-Metzger A. Comparison of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia to other sthapylococcal species in a neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr*. 2007;166(4):319-25.

32. Maraga NF, Aigbivbalu L, Masnita-Iusan C, Wludyka P, Shareef Z, bailey c, Rathore MH. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and infection among infants at a level II neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2011;39:35-41.

33. Sakaki H, Nishioka M, Kanda K, Takahashi Y. An investigation of the risk factors for infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus among patients in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2009;37:580-6.

34. Seybold U, Halvosa J, White N, Voris V, Ray S, Blumberg H. Emergence of and risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus of community origin in intensive care nurseries. *Pediatrics*. 2008;122:1039-46.

35. Rutar T. Vertically acquired community methicillin-resistant Staphylococcus aureus dacryocystitis in a neonate. *J AAPOS*. 2009;13:79-81.

36. Morel AS, Wu F, Della-Latta P, Cronquist A, Rubenstein D, Saiman L. Nosocomial transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a mother to her preterm quadruplet infants. *Am J Infect Control*. 2002;30:170-3.

37. Chatzakis E, Scoulica E, Papageorgiou N, Maraki S, Samonis G, Galanakis E. Infant colonization by Staphylococcus aureus: role of maternal carriage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:1111-7.

38. Andrews WW, Schelonka R, Waites K, Stamm A, Cliver SP, Moser S. Genital tract methicillin-resistant Staphylococcus aureus: risk of vertical transmission in pregnant women. *Obstet Gynecol*. 2008;111:113-8.

39. Lazenby GB, Soper DE, Beardsley W, Salgado CD. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization among women admitted for preterm delivery*. Am J Obstet Gynecol*. 2012;206:329.e1-5.

40. Patel RI, Kaufman HK. Nasopharyngeal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: incidence and outcomes in pregnant women. *J Am Osteopath Assoc*. 2011;11:389-95.

41. Reusch M, Ghosh P, Ham C, Klotchko A, Singapuri S, Everett G. Prevalence of MRSA colonization in peripartum mothers and their newborn infants. *Scand J Infect Dis*. 2008; 40:667-71.

42. Da Silva Vieira MA, Minamisava R, Pessoa-Junior V, Lamaro-Cardoso J, Ternes YM, Andre MC, Sgambatti S, Kipnis A, Andrade AL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in neonates and children attending a pediatric outpatient clinics in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2013;Pii: S1413-8670:00222-5.

43. Oliveira G, Faria J, Levy C, Mamizuka E. Characterization of the Brazilian Endemic Clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals Throughout Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2001;5:163-70.

44. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS. Prevalence of SCC*mec* type IV in nosocomial bloodstram isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol.* 2005;43:3435-7.

45. Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, Pacheco RL, Costa SF, Reinert C, Hiramatsu K, Mamizuka E, Garcia CP, Levin AS. Differences between “classical” risk factors for infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal caste chromosome *mec* type IV MRSA strain. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30:139-45.

46. Caiaffa-Filho HH, Trindade PA, Gabriela da Cunha P, Alencar GV, Rossi F, Levin AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bactermia. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2013;76:518-20.

47. Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutric*. 2008;138:1801s-6s.

48. Li M, Rigby K, Lai Y, Nair V, Peschel A, Schittek B, Otto M. Staphylococcus aureus mutant screen reveals interaction of the human antimicrobial peptide dermcidin with membranes phospholipids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4200-10.

49. Novak FR, da Silva AV, Hagler NA, Figueiredo MAS. Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol*. 2000;49:1109-17.

50. Kawada M, Okuzumi K, Hitomi S, Sugishita C. J Transmission of Staphylococcus aureus between healthy, lactating mothers and their infants by breastfeeding*. J Hum Lact.* 2003;19:411-7.

51. Isaacs CE. Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically*. J Nutr*. 2005;135:1286-8.

52. Verkaik NJ, Boelens HA, Vogel CP, Tavakol LG, Bode LGM, Verbrugh HA, van Belkum A, van Wamel WJ. Heterogenity of the humoral immune response following Staphylococcus aureus bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:509-18.

53. Kramer MF, Jordan TR, Pfrogner E, Rasp G. Humoral mucosal immunity in allergic rhinitis. *Laryngorhinootologie.* 2005;84:503-10.

54. Chih-Jung C, Kuang_Hung H, Tzou-Yien L, Kao-Pin H, Po-Yen C, Yhu-Chering H. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among healt children in Taiwan. *J Clinic Microbiol*. 2011;49:131-7.

55. Tong SY, Steer AC, Jenney AW, Carapetis JR. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections in the tropics. *Dermatol Clin*. 2011;29:21-32.

56. Baillargeon J, Kelley MF, Leach CT, Baillargeon G, Pollock BH. *Clin Infect Dis*. 2004;38:e92-5.

57. Andrews WW, Schelonka R, Waites K, Stamm A, Cliver SP, Moser S. Genital tract methicillin-resistant Staphylococcus aureus: risk of vertical transmission in pregnant women. *Obstet Gynecol*. 2008;11:113-8.

58. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.

59. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of Staphylococcus aureus. *Infect Genet Evol.* 2008;8:747-63.

60. Jarraud S, Mougel C, Thiolouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70:631-41.