RENATA LIMA PACHECO

Avaliação da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a
oxacilina em Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara Shafferman
Levin

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pacheco, Renata Lima

Avaliação da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas / Renata Lima Pacheco. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Anna Sara Shafferman Levin.

Descritores: 1.*Staphylococcus aureus* 2.Resistência a metilina 3.Epidemiologia molecular 4.Infecção hospitalar

USP/FM/SBD-218/08

*Aos meus queridos pais, Denise e Pacheco,
com carinho e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Anna Sara Levin, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, amizade e paciência.

À professora Dra. Silvia Figueiredo Costa, pelas sugestões, ensinamentos, amizade e apoio nestes anos.

À minha colega e amiga Dra. Priscila de Arruda Trindade, pelo auxílio na realização deste trabalho, ensinamentos, sugestões e apoio desde o início.

À professora Dra. Elsa Masae Mamizuka, pelos bons conselhos, sugestões e apoio.

Ao Dr. Edson Abdala, pelas sugestões.

Ao Dr. Caio Marcio Figueiredo Mendes, pelas sugestões.

A todos os colegas do LIM-54: Robson, Mauro, Anna Karina, Liang, Ana Paula, Andréia, Lourdes, Karin, Luciana e, em especial, a Inneke, pelo carinho, auxílio, paciência, amizade e convívio agradável.

Ao Elthon, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao pessoal do Grupo de Controle de Infecção Hospitalar: Renata, Maura e Sueli, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao pessoal da Sub-Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, em especial a Cleide.

À Ligia Maria Quiterio e todos da Enfermaria de Dermatologia.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação do departamento de Moléstias Infeciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina: Roseli e Vânia.

À Déa e ao Edmar, queridos, pela amizade e apoio.

Ao Fernando, pelo carinho, amor, compreensão, apoio e amizade.

Às minhas queridas amigas Caroline, Melissa e Viviana.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho.

Estudo realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), projeto 2006/03003-7 e bolsa de Mestrado 05/5754-0.

Esta dissertação está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Objetivos	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Coletas de vigilância	16
3.2 Pesquisa de MRSA.....	17
3.3 Teste de Resistência a Oxacilina.....	18
3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene <i>mecA</i> e gene da coagulase	18
3.5 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos	20
3.6 Determinação do tipo SCC <i>mec</i>	23
3.7 Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em campo pulsado (PFGE)	26
4. Resultados	29
4.1 Detecção do gene <i>mecA</i> e do gene da coagulase	34
4.2 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos	35
4.3 Determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	38
4.4 Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em campo pulsado (PFGE)	40
5. Discussão	49
6. Conclusões	56
7. Anexos	57
8. Referências.....	62

Resumo

Pacheco RL. Avaliação da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina em Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Staphylococcus aureus é um patógeno versátil, capaz de causar uma grande variedade de infecções. Nos últimos anos, ocorreu um aumento da proporção de infecções causadas por *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). A resistência a meticilina deve-se à presença do gene *mecA*, carregado no cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*). Pacientes infectados ou colonizados por MRSA são reservatórios e fontes de disseminação deste microorganismo, em instituições de cuidado à saúde, principalmente através de profissionais transitoriamente colonizados. Frequentemente, a infecção por MRSA é precedida por um período de colonização. Em 2003 foi observado um aumento das taxas de infecções hospitalares por *S. aureus* na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas (EDER), em relação aos cinco anos anteriores. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a transmissão hospitalar de MRSA, entre os pacientes da EDER e caracterizar os isolados de MRSA, obtidos de pacientes e funcionários colonizados, presentes nessa unidade. Foi realizada a detecção dos pacientes colonizados por MRSA, através de culturas de vigilância das narinas e, quando possível, culturas de vigilância das lesões de pele, num período de seis meses. A identificação fenotípica foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para detecção dos genes *mecA* e *coa*. Posteriormente, os isolados de MRSA foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo, PCR multiplex para determinação do tipo de SCC*mec* e tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Quarenta e cinco por cento dos pacientes eram portadores de MRSA. No início do estudo, 14% dos funcionários eram portadores de MRSA, no fim eram 18%. Foram obtidas 105 amostras de MRSA, sendo que 11 foram isoladas de funcionários da EDER e 94 isoladas de 64 pacientes que eram portadores deste microorganismo. Sessenta e um por cento dos pacientes classificados como portadores de MRSA, eram positivos na primeira coleta realizada e 39% foram identificados durante o seguimento, nas coletas posteriores. O gene da coagulase foi detectado em todas as 105 amostras e o gene *mecA* em 101. Todos os isolados foram sensíveis a vancomicina e resistentes a oxacilina e penicilina. Trinta e três por cento dos isolados eram multirresistentes, apresentaram SCC*mec* tipo IIIA e um perfil PFGE predominante. SCC*mec* tipo IV foi observado em 59% dos isolados. Não foi possível determinar o tipo de SCC*mec* de quatro isolados. Na PFGE, o perfil B1 foi o mais prevalente, apresentado por isolados de MRSA SCC*mec* tipo IV, obtidos de nove pacientes e de três funcionários. A transmissão hospitalar foi caracterizada em 39% dos pacientes portadores. Foi possível observar a participação dos funcionários, na transmissão cruzada de MRSA, na EDER. A colonização por MRSA, dos profissionais de cuidado à saúde, foi transitória. Além da transmissão hospitalar de MRSA, foi possível detectar pacientes que eram portadores de MRSA na admissão.

Descritores: *Staphylococcus aureus*, resistência a meticilina, epidemiologia molecular, infecção hospitalar.

Summary

Pacheco RL. Evaluation of the spread of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Dermatology ward of Hospital das Clínicas [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008.

Staphylococcus aureus is a versatile pathogen capable of causing a wide variety of infections. The proportion of nosocomial and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections has increased in the last years. Methicillin resistance is mediated by the *mecA* gene which is carried on the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). In health care settings, patients who are colonized or infected with MRSA constitute a reservoir and a source of spread of this microorganism, mainly through transiently colonized health care workers (HCWs). MRSA infections are usually preceded by a period of colonization. In 2003, an increase in the rates of MRSA nosocomial infection in the Dermatology ward of Hospital das Clínicas was observed, in comparison with the five previous years. The aims of this study were to evaluate the nosocomial transmission of MRSA in the Dermatology ward and to characterize MRSA isolates obtained from patients and HCWs. Surveillance cultures of the anterior nares and skin lesions were performed to identify patients who were MRSA carriers, during a period of six months. The phenotypic identification was confirmed by multiplex polymerase chain reaction (PCR), to detect *mecA* and *coa* genes. Subsequently, MRSA isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing by microdilution method, multiplex PCR for SCC*mec* typing and molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Forty-five percent of the patients were MRSA carriers. 14% of the HCWs were MRSA carriers at the beginning of the study and 18% at the end. One hundred and five MRSA isolates were obtained, 11 from HCWs and 94 from 64 patients who were MRSA carriers. Sixty-one percent of the patients, classified as MRSA carriers, were positive on the first culture and 39% were identified during the follow up period in the subsequent cultures. The coagulase gene was detected in all 105 isolates and the *mecA* gene in 101. All MRSA isolates were susceptible to vancomycin and resistant to oxacillin and penicillin. Thirty-three percent of the isolates were multiresistant, presented SCC*mec* Type IIIA and showed a predominant PFGE type. The SCC*mec* type IV was found in 59% of the isolates. It was not possible to determine the SCC*mec* type of four isolates. The B1 PFGE pattern was the most prevalent, presented by MRSA SCC*mec* type IV isolates, obtained from nine patients and three HCWs. Nosocomial transmission occurred in 39% of the MRSA carriers. It was possible to observe HCWs MRSA cross- transmission in the Dermatology ward. HCWs were transiently colonized. In addition to nosocomial transmission of MRSA, it was possible to detect patients who were MRSA carriers on admission.

Descriptors: *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistance, molecular epidemiology, nosocomial infection.

1. Introdução

A importância de *Staphylococcus aureus* como causador de infecções

Staphylococcus aureus é reconhecido como um importante patógeno humano há muitos anos (Kluitmans e Wertheim, 2005). É um microorganismo versátil, responsável por um amplo espectro de doenças, incluindo septicemia, endocardite, pneumonia, osteomielite, artrite séptica, bacteremia, infecções da pele, de feridas, do sistema nervoso central, do trato urinário e infecções associadas com dispositivos intravasculares e corpos estranhos (Crossley et al., 1997; Feil et al., 2003; Fey et al., 2003; Gordon e Lowy, 2008).

Staphylococcus aureus é considerado o principal agente causador de infecções adquiridas tanto na comunidade como em ambiente hospitalar (Francois et al., 2007). Este microorganismo é uma das causas mais frequentes de infecções associadas ao cuidado à saúde relatada pelo *National Nosocomial Infection Surveillance System* (EUA), incluindo pneumonia associada à ventilação, infecções de sítio cirúrgico e bacteremia associada a cateter (Kuehnert et al., 2005). Bacteremia por *Staphylococcus aureus* é uma das principais causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Das et al., 2007).

A vasta maioria das infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* resulta de portadores assintomáticos, em que o indivíduo pode ser colonizado por períodos curtos ou longos, causando doença quando há algum comprometimento do sistema imunológico. Esta espécie, no entanto, representa um sério problema de saúde pública, particularmente em ambientes hospitalares onde clones, resistentes a

meticilina e outras classes de antibióticos, são endêmicos e pode ocorrer uma diminuição da sensibilidade a vancomicina (Rubin et al., 1999; Feil et al., 2003).

Ainda que *Staphylococcus aureus* seja considerado um patógeno oportunista, é provável que certos clones tenham maior tendência em causar doenças invasoras que outros, devido à presença de fatores de virulência que aumentam sua possibilidade de alcançar sítios normalmente estéreis (Rubin et al., 1999; Feil et al., 2003). Infecções graves provocadas por este microorganismo podem ocorrer frequentemente em pacientes hospitalizados podendo gerar consequências preocupantes, principalmente com relação à antibioticoterapia (Kluitmans et al., 1997; Felten et al., 2002). Mais de 95% dos *Staphylococcus aureus* em pacientes com infecções, em todo o mundo, não são sensíveis a tratamentos com antibióticos como penicilina e ampicilina (Rubin et al., 1999).

Desde que MRSA foi descrito pela primeira vez como um dos principais patógenos hospitalares, na década de 60, a incidência das infecções causadas por este microorganismo continua aumentando em instituições de cuidado à saúde e, mais recentemente, na comunidade, em todo o mundo (Bukharie et al., 2001; Safdar et al., 2003; Boucher e Corey, 2008).

A epidemiologia de MRSA e os fatores de resistência sustentam fortes analogias àquilo ocorrido anteriormente com as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, nas décadas de 40 e 50. A introdução da benzilpenicilina teve um efeito marcante nas taxas de mortalidade provocada por *Staphylococcus aureus* invasores. Quando foram descritas e publicadas as primeiras cepas produtoras de penicilinase, em 1944, a resistência era raramente encontrada e havia poucas cepas disponíveis para estudo. Assim como os MRSA, cepas produtoras de penicilinase

foram isoladas primeiramente em pacientes hospitalizados. Cepas da comunidade costumavam serem sensíveis à penicilina. O aumento da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes a benzilpenicilina foi inicialmente superado pela introdução de penicilinas semi-sintéticas. Como foi observado décadas mais tarde com MRSA, tratamento prévio com antibióticos beta-lactâmicos, aumentava a chance de isolamento de uma cepa resistente à penicilina (Chambers, 2001; Felten et al., 2002).

A meticilina foi introduzida em 1959 para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. Em 1961, no Reino Unido, ocorreram os primeiros relatos de cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), que rapidamente emergiram em outros países europeus, onde ocorreram surtos de infecções hospitalares provocados por este microorganismo. Em seguida, também houveram relatos de MRSA isolados no Japão, Austrália, Estados Unidos e subsequente, foram disseminados pelo mundo. Desde então, MRSA tornaram-se um importante problema clínico, sendo considerado um dos principais causadores de infecções, de tratamento cada vez mais difícil, especialmente em pacientes graves, devido às limitadas opções terapêuticas (Rubin et al., 1999; Shopsin e Kreiswirth, 2001; Enright et al., 2002; Tverdek et al., 2008).

Em 1996, 57% dos *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes franceses, com infecções hospitalares, eram resistentes a meticilina (Felten et al., 2002). Dados do *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNISS) mostraram que no ano de 2003, MRSA foi responsável por 59,5% de todas as infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, nas unidades de cuidados intensivos dos 300 hospitais

participantes do NNIS. (NNISS, 2004). Outro estudo desenvolvido pelo NNISS entre 1987 a 1997 mostrou que o número de infecções causadas por MRSA em unidades de terapia intensiva continua aumentando e estas bactérias também se tornaram resistentes a outros agentes antimicrobianos. Este mesmo levantamento epidemiológico mostrou que a proporção de isolados de MRSA sensíveis somente a vancomicina foi de 22,8% em 1987 para 52,6% em 1997 (Lowy, 1998).

No Brasil, a frequência de isolamento de *Staphylococcus aureus* e sua relação com infecções hospitalares atingem valores elevados. Em muitos hospitais brasileiros, a prevalência de isolamento de cepas de MRSA varia de 40 a 80% (Oliveira et al., 2001; Trindade et al., 2005). Caiaffa et al. (1994), em um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, demonstraram que 40% dos *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes ambulatoriais e 70% dos isolados em pacientes internados eram resistentes a meticilina.

As infecções causadas por MRSA elevam o tempo de estadia nos hospitais, oneram os custos e têm uma elevada mortalidade atribuída. Além disso, a presença de MRSA em uma instituição está claramente relacionada com um número aumentado de bacteremias que prolongam o tempo de permanência no hospital, quando comparado com bacteremias provocadas por *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina (Francois et al., 2003; Cosgrove et al., 2005).

Além de ter-se estabelecido mundialmente como o principal patógeno hospitalar, MRSA está se tornando cada vez mais prevalente em infecções de origem comunitária (O'Brien et al., 1999; Bhattacharya et al., 2007). Diversas definições relacionadas às infecções comunitárias por MRSA (Community-acquired MRSA/

CA-MRSA) têm sido utilizadas, o que dificulta comparações entre os estudos. Os critérios de classificação das infecções, por CA-MRSA, recomendados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) são: diagnóstico de MRSA em até 48h após a admissão no hospital; ausência de histórico de infecção ou colonização por MRSA e de hospitalização, diálise ou cirurgia nos últimos 12 meses e ausência de cateter permanente ou dispositivo médico invasivo (Salgado et al., 2003; Miller et al., 2008). A predileção de CA-MRSA por hospedeiros saudáveis, especialmente crianças, tem sido motivo de muita preocupação, apesar de não surpreendente, visto que *Saphylococcus aureus* pode iniciar infecções de pele onde não há um trauma visível ou evidente ruptura da barreira do estrato córneo. Crianças são propensas ao desenvolvimento de infecções de pele como impetigo, podendo facilmente de um caso índice, disseminar a infecção. Diversos estudos em departamentos de dermatologia demonstram que MRSA (frequentemente CA-MRSA) estão evidentemente presentes no eczema atópico, bem como em uma ampla escala de infecções de pele primárias e secundárias. Um estudo japonês demonstrou que 20,2% de 109 *Saphylococcus aureus* isolados de pacientes com infecções de pele e tecidos moles entre novembro de 1995 a outubro de 1998, e 29,4% de 119 isolados de lesões de pele de pacientes com dermatite atópica, foram MRSA. Todos os pacientes eram ambulatoriais, sugerindo que a maior parte das infecções podem ter sido adquirida na comunidade (Nishijima e Kurokawa, 2002; Eady e Cove, 2003; Nishijim et al., 2003). Nos Estados Unidos foram relatados surtos de infecção de pele e tecidos moles por CA-MRSA entre atletas, em internatos e em presídios (King et al., 2006). No Uruguai, ocorreram sete óbitos em um surto de extensa proporção provocado por

este microorganismo, envolvendo presídios, hospitais e pacientes ambulatoriais (Ma et al., 2005).

Mecanismos de resistência de *Staphylococcus aureus* a antimicrobianos beta-lactâmicos

Staphylococcus aureus produzem quatro proteínas de ligação à penicilina (PBPs) envolvidas na síntese da parede celular. Além dessas PBPs, uma outra PBP foi descoberta em MRSA, a qual foi chamada PBP2' ou PBP2a porque está localizada entre a PBP1 e a PBP2 quando separadas por eletroforese (Ito e Hiramatsu, 1998).

A resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus* deve-se, principalmente, à presença do gene *mecA* que codifica a PBP2a. A afinidade do sítio de ligação da PBP2a aos antibióticos beta-lactâmicos, exceto ampicilina e penicilina G, é acentuadamente menor que as outras PBPs. Esta baixa afinidade confere aos MRSA capacidade de crescimento em presença de antibióticos beta-lactâmicos, ou seja, a bactéria torna-se resistente a todos os antibióticos dessa classe, inclusive carbapenems, cefalosporinas e monobactâmicos (Ito e Hiramatsu, 1998; Hiramatsu et al., 1999; Daum et al., 2002). Em casos raros, o mecanismo de resistência a meticilina está associado com a hiper-produção de β -lactamase, PBPs alteradas (1,2 e 4) e hiper-produção de PBP4 (Reischl et al., 2000; Yoshida et al., 2003).

O gene *mecA* também está presente em estafilococos coagulase-negativa resistentes a meticilina e não está presente em cepas susceptíveis a este antimicrobiano. Acredita-se que este gene tenha sido adquirido de espécies que não têm relação próxima (Ito e Hiramatsu, 1998; Enright et al., 2002).

Múltipla resistência de *Staphylococcus aureus*

O gene *mecA* é carregado em um elemento genético móvel que está integrado no cromossomo das cepas MRSA, o cassete cromossômico estafilocócico (“staphylococcal cassette chromosome *mec*”- SCC*mec*) do qual cinco formas (tipos I,II,III,IV e V), que diferem no tamanho e na composição genética entre as cepas, foram bem descritos (Enright et al., 2002; Branger et al., 2003; Ito et al., 2004).

O tipo I (34 kb) foi detectado na cepa NCTC 10442, o primeiro MRSA isolado em 1961, no Reino Unido, o tipo II (52 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada no Japão em 1982, denominada N315, e o tipo III (66 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada em 1985 na Nova Zelândia e foi denominada 82/2082. Posteriormente, foi identificado, em duas cepas associadas a infecções comunitárias, o menor elemento *mec*, o tipo IV (20 a 24 kb), que confere aos MRSA um perfil de sensibilidade diferente dos outros três tipos, sendo sensível às outras classes de antimicrobianos, que não os beta-lactâmicos. (Duarte e Lencastre, 2002; Okuma et al.,2002). O último elemento descoberto foi o *mec* tipo V (28kb), descrito a partir do cromossomo de uma cepa de MRSA, de origem comunitária, isolada na Austrália, denominada WIS (WBG8318). Este elemento foi estruturalmente similar ao SCC*mec* tipo IV. (Ito et al., 2004).

Os SCC*mec* tipos I,II e III estão associados a cepas de origem hospitalar que têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos beta-lactâmicos como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol e quinolonas (Hiramatsu et al., 1999). Muitos isolados de MRSA que apresentam múltipla resistência são susceptíveis apenas aos glicopeptídeos como a vancomicina. Os SCC*mec* tipo IV e V não possuem nenhum outro determinante de

resistência a antimicrobianos além do gene *mecA*, o que explica uma das principais características dos isolados comunitários de MRSA, a sensibilidade a diversos antimicrobianos não beta-lactâmicos. (Duarte e Lencastre, 2002; Enright et al., 2002; Okuma et al., 2002; Ito et al., 2004).

Importância de pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina na disseminação de infecções

Desde sua emergência há muitas décadas, MRSA vem sendo reconhecido como um patógeno de importância mundial, entretanto, estratégias eficazes de prevenção da transmissão deste microorganismo são bastante questionadas (Farrington et al., 1998; Harbath, 2006). Apesar de haver uma vasta literatura sobre este tópico, o impacto de medidas intensivas de controle, sobre a proporção de pacientes com infecções graves, assim como da maior parte das efetivas estratégias de vigilância permanece controversa. Alguns estudos mostraram que vigilância eficaz, triagem abrangente dos pacientes e medidas de controle diminuíram o reservatório de MRSA com uma subsequente redução na taxa da infecção, enquanto outros não observaram este resultado (Farrington et al., 1998; Harbath et al., 2000; Safdar et al., 2006).

Pacientes infectados ou colonizados por MRSA são importantes reservatórios e fontes de disseminação deste microorganismo para outros pacientes, em instituições de cuidado à saúde (Pujol et al., 1996; Ridenour et al., 2006). As diretrizes do CDC recomendam precauções de contato para todos os pacientes sabidos ou suspeitos de estarem colonizados ou infectados por microorganismos

epidemiologicamente importantes, como MRSA, para diminuição do risco de disseminação (Jerigan et al., 1996; Karchmer et al., 2002).

A colonização por *Staphylococcus aureus* tem sido apontada como um fator de risco para o desenvolvimento de infecções, o que já foi amplamente estudado em pacientes cirúrgicos, infectados pelo vírus HIV, internados em unidade de terapia intensiva (UTI), submetidos à hemodiálise e em diálise peritoneal ambulatorial contínua (Kluitmans e Wertheim 2005). Portadores nasais de *Staphylococcus aureus* apresentam uma taxa mais elevada de infecções em feridas hospitalares do que pacientes que não são portadores do microorganismo (Lee et al., 1999; Kuehnert et al., 2006). Os fatores de risco para a aquisição de MRSA incluem a administração de múltiplos antimicrobianos. A microbiota bacteriana nasal é modificada quando antimicrobianos de uso sistêmico são administrados. Estudos comparando cepas sensíveis e cepas resistentes a meticilina mostraram que não há diferença em suas habilidades para aderir em células do epitélio nasal, sugerindo que a pressão seletiva por algumas terapias antimicrobianas podem favorecer a recolonização por cepas resistentes. A colonização por MRSA constitui um problema em especial no que diz respeito à prevenção e o tratamento da infecção (Pujol et al., 1996; Kluitmans et al., 1997). A colonização nasal por MRSA, e também de outros sítios como pele, faringe, períneo, virilha e axila, representa um papel importante como um reservatório e na disseminação de infecções por este microorganismo (Parras et al., 1995; Wertheim et al., 2005).

Pacientes colonizados por MRSA apresentam um risco maior de infecção invasiva, em relação aos pacientes não colonizados e àqueles colonizados por *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) (Safdar e Bradley, 2008). Durante um surto

hospitalar ocorrido no fim de 1989, na Espanha, foi observada uma elevada incidência de bacteremia por MRSA entre portadores nasais de *Staphylococcus aureus* admitidos na unidade de terapia intensiva, enquanto a incidência de bacteremia por *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina permaneceu estável (Pujol et al., 1996). Outro estudo demonstrou que a alta prevalência de infecções de pele por MRSA representa um fator de risco para a colonização nasal persistente deste microorganismo, aumentando sua transmissão entre as pessoas. Além disso, pacientes com enfermidades da pele têm um risco maior não somente de adquirir infecções, mas também da dispersão de cepas infectantes (Borer et al., 2002).

Infecções por MRSA frequentemente são precedidas por um período de colonização (Mir et al., 1998; Safdar e Bradley, 2008). A triagem dos portadores de MRSA, melhor que simples identificação de pacientes infectados, tem se mostrado um componente importante das estratégias para controle dos surtos de infecção por MRSA, objetivando identificar pacientes portadores, que representam reservatórios ocultos deste microorganismo e então, adotar as precauções adequadas de isolamento (Francois et al., 2003; Levi et al., 2003; Ben-David et al., 2008). Muitas vezes a propagação de MRSA ocorre de paciente para paciente, através das mãos transitoriamente colonizadas dos profissionais da saúde, ou pela manipulação de materiais contaminados, durante o contato com os pacientes (Pittet e Waldvogel, 1997; Harbarth et al., 2006; Albrich e Harbarth, 2008). O nicho ecológico das cepas de *Staphylococcus aureus* são as narinas anteriores, região mais consistente em que este microorganismo pode ser isolado, e de onde pode ser disseminado para outras partes do organismo. Além disso, em muitos casos o tratamento das narinas anteriores, para eliminar a colonização nasal por *Staphylococcus aureus*, pode

resultar no desaparecimento deste microorganismo em outras áreas do corpo (Kluitmans et al., 1997; Singh et al., 2003) A detecção precoce dos portadores de MRSA é essencial na investigação epidemiológica, na rápida implementação de isolamento dos pacientes colonizados (como o uso de avental e luvas para todo o contato direto), na decisão da terapêutica mais adequada e, finalmente para o controle e prevenção da disseminação dos isolados de MRSA (Mir et al., 1998; Francois et al., 2003; Safdar et al., 2003).

A detecção da colonização nasal por *Staphylococcus aureus* pode ser de grande relevância clínica por preceder bacteremias assim como outras infecções. Em um surto provocado por MRSA, ocorrido na unidade de terapia intensiva neonatal de dois hospitais, em que foram avaliados diversos sítios para a detecção da colonização por este microorganismo, foi demonstrado que o uso exclusivo de culturas de vigilância, coletadas das narinas, detectaria 97% nos neonatos colonizados por MRSA, em ambos os hospitais (Singh et al., 2003).

Os profissionais da saúde têm uma participação na transmissão cruzada de MRSA. Em um surto ocorrido em uma UTI neonatal, os isolados de MRSA detectados em profissionais colonizados, eram idênticos aos dos pacientes. Dados da literatura sugerem que 5% dos profissionais da saúde são colonizados por MRSA. No entanto, freqüentemente a colonização desses profissionais é transitória e eles atuam como vetores de MRSA, não sendo caracterizados como as principais fontes de transmissão. (Saiman et al., 2003; Albrich e Harbarth, 2008; Ben-David et al., 2008).

Infeções por MRSA na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas

No primeiro quadrimestre de 2003 foi observado um aumento das taxas de infecções hospitalares por *S. aureus* na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas (EDER), em relação aos cinco anos anteriores (figura 1). A taxa de isolados por paciente-dia corresponde ao número de infecções hospitalares em relação à soma dos dias em que os pacientes ficam internados na EDER, num determinado período de tempo. A taxa de isolados por saída corresponde ao número de infecções hospitalares em relação ao número de pacientes que saem da EDER, num determinado período de tempo. Os pacientes podem deixar a enfermaria porque recebem alta hospitalar, ou porque são transferidos para outro setor, ou ainda, porque evoluem para o óbito.

Figura 1 - Taxas de infecção hospitalar por *S.aureus* na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas, de 1998 a 2003.

No período de janeiro a junho de 2003, houve 12 casos de infecção hospitalar provocadas por *S. aureus* na EDER, das quais foram dois de pele, um de articulação, um endocardite, um de sítio cirúrgico e sete infecções primárias de corrente sanguíneas, todas definidas de acordo com os critérios estabelecidos pelo CDC (Garner et al., 1988). Os isolados eram resistentes a oxacilina em 50% dessas infecções. Coletas de vigilância de portadores de MRSA foram realizadas em duas ocasiões, em que foram realizadas culturas de narinas dos pacientes e dos profissionais da EDER. Na primeira coleta, em maio, 32% de 22 profissionais e 71% de 16 pacientes foram positivos para MRSA. Na segunda coleta, 45 dias depois, esse resultado foi de 14% entre os 22 funcionários e de 64% entre 14 pacientes. Programas educativos quanto à higiene das mãos e boas práticas foram realizados entre as coletas.

Um estudo realizado por Trindade et al. (2005), no HC-FMUSP, demonstrou que ocorreram 19 casos de infecções de corrente sanguínea, provocadas por MRSA portadores de *SCCmec* tipo IV. Seis casos (32%) foram detectados em pacientes internados na EDER. Todas as infecções foram classificadas como de origem hospitalar.

O aumento na frequência de infecções por MRSA é preocupante, particularmente com respeito ao impacto sobre as estratégias de terapia antimicrobiana. As lesões de pele apresentadas pelos pacientes da EDER facilitam a colonização, a transmissão e o desenvolvimento de infecções por esse microorganismo. Como os pacientes muitas vezes podem ser submetidos a procedimentos médicos em outros setores do hospital, o microorganismo carregado

pelos pacientes colonizados e/ou infectados, pode ter sua disseminação favorecida para outros departamentos do hospital.

2. Objetivos

- Avaliar a transmissão hospitalar de MRSA, entre os pacientes da Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas, num período de seis meses;
- Caracterizar, fenotipicamente e genotipicamente, os isolados de colonização por MRSA, obtidos de funcionários e pacientes, presentes nessa unidade durante o período de estudo.

3. Material e Métodos

O estudo foi realizado na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas, (EDER) onde há 20 leitos, distribuídos em 10 quartos de um, dois ou quatro leitos. Ocorrem, em média, 30 internações por mês nessa unidade. A soma dos dias em que todos os pacientes permanecem internados nessa enfermaria é de 4500 por ano, em média.

Todos os experimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Investigação Médica em Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 54).

3.1 Coletas de vigilância

Foi realizada a detecção dos pacientes colonizados por MRSA, através de culturas de vigilância das narinas e, quando possível, culturas de vigilância das lesões de pele. As coletas foram realizadas com *swabs* estéreis, conforme descrito por Murray et al., 1999. Os pacientes que eram detectados portadores de MRSA foram submetidos a isolamento de contato, enquanto culturas de vigilância, acima descritas, foram realizadas semanalmente entre os não portadores e novos pacientes da EDER, durante 26 semanas, período que foi de 31 de maio a 21 de novembro de 2005. A partir 13ª semana do estudo, também foram realizadas coletas de vigilância, no momento da admissão do paciente na EDER. Houve necessidade de os pacientes concordarem com as coletas e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. Aqueles que não estiveram de acordo foram submetidos ao isolamento, assegurando que todos os potenciais portadores de MRSA estariam isolados. Foram

realizadas duas culturas de vigilância das narinas dos funcionários da EDER, sendo uma antes do período de estudo e outra após, para uma comparação entre as taxas de colonização por MRSA, no início e no fim do período de estudo.

Dos prontuários dos pacientes foram obtidos os seguintes dados: idade, sexo, doença de base, internações hospitalares anteriores, uso de antimicrobianos e data de internação no Hospital das Clínicas da FMUSP. Os dados foram utilizados neste projeto de pesquisa e, sendo sigilosos, não serão divulgados individualmente.

3.2 Pesquisa de MRSA

Os *swabs* com as amostras clínicas foram semeados em ágar sal-manitol e em caldo infusão cérebro coração (BHI). Em seguida, as culturas foram incubadas a 35°C por 48 h. *Staphylococcus aureus* fermentam manitol formando colônias de características sugestivas deste microorganismo (Singh et al., 2003). Na ausência dessas colônias, foram realizados subcultivos em ágar sal-manitol, a partir do caldo BHI, com a finalidade de melhorar a sensibilidade da pesquisa de *S. aureus*.

Colônias suspeitas de *Staphylococcus aureus* foram repicadas em ágar-sangue de carneiro, incubadas a 35°C por 24 h e, posteriormente, submetidas à coloração de Gram, prova da catalase e DNase, para sua identificação fenotípica (Mir et al., 1998). Os isolados de *Staphylococcus aureus* identificados foram submetidos ao teste de triagem para detecção de resistência a oxacilina, conforme recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atual CLSI (*Clinical laboratory Standards Institute*).

3.3 Teste de Resistência a Oxacilina

Para a realização do teste de triagem utilizado na detecção de resistência a oxacilina, preparou-se ágar Mueller-Hinton adicionando 4% de cloreto de sódio e oxacilina, de maneira que a concentração do antimicrobiano no meio de cultura foi de 6 µg/ml (NCCLS, 2002). As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (susceptível) e NCTC 10442 (resistente) foram utilizadas no controle de qualidade do teste.

Preparo do inóculo. Foi preparada uma suspensão bacteriana, a partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, na escala 0,5 de McFarland ($1,8 \times 10^8$ UFC/ml). A concentração foi determinada por espectrofotometria.

Inoculação. A partir da suspensão preparada, com o auxílio de um *swab*, foi feito um *spot* com 10 a 15 mm de diâmetro no meio de cultura (NCCLS, 2002).

Incubação. A placa foi incubada por 24 horas a 35°C (NCCLS, 2002).

Interpretação dos resultados. Havendo crescimento maior ou igual a uma colônia, a cepa foi considerada resistente (NCCLS, 2002).

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *mecA* e gene da coagulase

Todos os isolados de MRSA, identificados fenotipicamente, foram confirmados por PCR. Foi utilizado o kit NCL-SA-PS (Novo Castra, Reino Unido). Basicamente, o kit consiste de um conjunto de *primers* 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 amplificam uma região de 214bp do gene *mecA*, enquanto os *primers* SA-3 e SA-4 amplificam uma região conservada de 117bp do gene da coagulase, permitindo portanto a diferenciação simultânea entre *S. aureus* (coagulase positiva) e estafilococos coagulase negativa. O DNA utilizado para controle interno de reação é adicionado à mistura de reação e co-amplifica com os *primers* SA-1 e SA-2, formando um produto de amplificação de 150bp. Esse controle interno auxilia na detecção de resultados falso negativos.

Extração do DNA genômico. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o kit comercial “Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation” (Amersham Pharmacia Biotech, Alemanha), conforme as instruções do fabricante.

Reação de amplificação. Para a reação de amplificação, foi preparada uma mistura de reação contendo Tris-HCl 10mM (pH8,8), MgCl₂ 4mM, KCl 50mM, 0,1% de Triton X-100, 200μM de cada dNTP, 25pmol de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. Subseqüentemente, foram adicionados 1μl da amostra à 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, seguem-se mais 20 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 2min a 72°C (Kearns et al., 1999). 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 *mecA* foram utilizados os DNAs extraídos das cepas de *S. aureus* NCTC10442 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* ATCC29213 e *Staphylococcus*

epidermidis, respectivamente. Em todas as reações foi utilizada como controle negativo água destilada deionizada estéril.

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 30 minutos 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.

3.5 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição em caldo.

Os isolados de MRSA foram submetidos ao teste de susceptibilidade com os seguintes antimicrobianos: penicilina, oxacilina, eritromicina, vancomicina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol e sulfametoxazol/ trimetoprima. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada para o controle de qualidade do teste.

Preparo da solução estoque do antimicrobiano. A quantidade necessária do antimicrobiano a ser utilizada, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg})}$$

Para cada antimicrobiano foi preparada uma solução estoque na concentração de 10.000 µg/ml.

Número de diluições. As concentrações abrangeram os cortes descritos nas tabelas do documento M100-S12 do NCCLS, de 256µg/ml a 0,25µg/ml. A partir da solução estoque, com concentração igual a 10.000 µg/ml, foram realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado (NCCLS, 2002), até obter uma diluição com concentração de 256 µg/ml.

Preparo das diluições na microplaca. Foram colocados 50 µL de meio de cultura Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (CMHCA) em todos os poços da placa, exceto na coluna 1. Quando o antimicrobiano testado era oxacilina, foi adicionado 2% de cloreto de sódio ao CMHCA.

Foram colocados 100 µl da diluição a 256 µg/ml em todos os poços da coluna 1. Com uma pipeta multicanal, foi realizada a diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 µl do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). Após, foi realizada a homogeneização com a pipeta e em seguida 50 µl foram pipetados do poço A2 para o A3. Este procedimento foi repetido até o poço A11, deixando o poço A11 com volume final de 100 µl, designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço para verificar se houve contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A₁₂-H₁₂) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, aos 50 µl de meio de cultura CMHCA, foram adicionados 50 µl de suspensão bacteriana (diluída 1:100).

Preparo da suspensão bacteriana. A partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, preparou-se uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($1,8 \times 10^8$ UFC/ml), concentração esta determinada por espectrofotometria.

A suspensão bacteriana foi diluída 1:100 em CMHCA, para obtenção de um inóculo de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ UFC/ml (NCCLS, 2002).

Inoculação da suspensão bacteriana. 50µl da suspensão diluída foram inoculados nos poços de 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). A concentração final da suspensão foi de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml (NCCLS, 2002).

Incubação. As placas foram incubadas por 16 a 20 horas para penicilina, eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol e sulfametoxazol/ trimetoprima, e por 24 horas para oxacilina e vancomicina, em atmosfera ambiente a 35°C (NCCLS, 2002).

Leitura das CIMs. A leitura das placas foi realizada com auxílio de uma luminária e de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação de crescimento bacteriano nos pocinhos.

Interpretação dos resultados. Os critérios utilizados na interpretação das CIMs (tabela 1) estão os descritos pelo CLSI (M100-S17, 2007).

Tabela 1- Critérios de interpretação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos testados para *S. aureus*.

Agente Antimicrobiano	CIM (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ciprofloxacina	< 1	2	> 4
Clindamicina	< 0,5	1 – 2	4
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32
Eritromicina	≤ 0,5	1 – 4	≥ 8
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4
Penicilina	≤ 0,12	-	≥ 0,25
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	≤ 38/2	-	≥ 76/4
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16
Vancomicina	≤ 2	4 – 8	≥ 16

3.6 Determinação do tipo SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando-se o método de PCR multiplex, conforme descrito por Oliveira e de Lencastre (2002). Foram utilizados 8 loci (A-H) (tabela 2), selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente (Ito et al., 1999, 2001; Oliveira et al., 2001). O locus A está localizado *downstream* ao gene *pls* e é específico para o SCCmec tipo I; o locus B é um fragmento interno do operon *kdp*, que é específico para o SCCmec tipo II; o locus C é um fragmento interno do gene *mecI* presente nos SCCmec tipos II e III; o locus D é um fragmento interno da região *dcs*, presente nos SCCmec tipos I, II e IV; o locus E está localizado na região entre o plasmídeo pI258 e o transposon Tn554, sendo específico para o SCCmec tipo III; o locus F, também específico para o

SCC*mec* tipo III, está localizado entre o Tn554 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 a junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110; o locus H corresponde a junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181.

Extração do DNA genômico. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit comercial “Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation” (Amersham Pharmacia Biotech, Alemanha), conforme as instruções do fabricante.

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 no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer), utilizando o seguinte programa: 4 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 53°C e 1min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 4min a 72°C. Após, os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese (Oliveira e de Lencastre, 2002)

Como controles positivos para os diferentes tipos de SCC*mec* foram utilizadas as seguintes cepas de MRSA: NCTC 10442 (SCC*mec* tipo I), N315 (SCC*mec* tipo II), 85/2082 (SCC*mec* tipo III) e JSCS 1968 (SCC*mec* tipo IV). Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada.

Eletroforese. Após a reação de amplificação, os produtos de PCR 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 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.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*^a

Locus	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Localização	Tamanho do amplicon
A	CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	18398–18419 18892–18871	495
B	KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	10445–10467 10728–10707	284
C	MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACTTGTC	42428–42447 42636–42617	209
D	DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	38011–37992 37670–37689	342
E	RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	45587–45607 45829–45809	243
F	RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	59573–59594 59986–59965	414
G	IS431 P4 pUB110 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	49963–49982 50343–50323	381
H	IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	29654–29673 29976–29956	303
<i>mecA</i>	MECA P4 MECA P7	TCCAGATTACAACCTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	1190–1211 1351–1332	162

^a Oliveira e Lencaste, 2002.

3.7 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 3.345×g durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 1ml de solução salina estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga previamente pesado. Essa suspensão foi centrifugada a 23.100×g durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. A seguir, o sedimento foi re-suspensão com 1ml de solução salina estéril, centrifugado a 23.100×g durante 15 minutos e descartado o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi então pesado e ressuspensão em EDTA 50mM pH8,0, para uma concentração final de 100 µg de massa bacteriana por µl. Desta suspensão, 15 µl foram transferidos para um tubo de micro-centrífuga contendo 215 µl de tampão EC, adicionado de 250 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20 µl de solução de lisostafina (100 µg/ml) (Sigma, USA). Esta suspensão foi transferida para os moldes e permaneceu por 30 minutos a 4 °C, para que os blocos solidificassem. Após esta etapa, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 orifícios, contendo 2 ml 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 1 ml de tampão ES adicionado de 50 µl de solução de proteinase K (20 mg/ml) (Invitrogen USA), por uma noite à temperatura de 50°C. Os blocos foram então lavados com 2,5 ml de tampão CHEF TE (quatro lavagens com incubações de

uma hora cada) e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese (Pfaller, 1993).

Digestão enzimática. A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® *SmaI* (CCC↓GGG) (Fermentas Life Sciences, Canadá), que reconhece e cliva seqüências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Staphylococcus aureus* (12 a 20 sítios de restrição) (Prevost et al., 1992; Struelens et al., 1992). 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® *SmaI*. Em seguida, os blocos foram incubados por 6 minutos a 37°C.

Eletroforese. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, Usa) em TBE 0,5x (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, USA]) (Sambrook et al., 1989), 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 (Pfaller, 1993).

Após, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5 µg/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 (Pfaller, 1993).

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 por Tenover et al. (1995).

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.

4. Resultados

Durante os seis meses de avaliação dos pacientes na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas, período que foi de 31 de maio a 21 de novembro de 2005 (26 semanas), foram coletadas amostras de *swab* nasal, e quando possível, da lesão pele, de 153 pacientes. Foram excluídos 11 pacientes que tiveram seguimento incompleto. Dos 142 pacientes estudados, 78 (55%) não apresentaram nenhuma cultura positiva para MRSA. Dos 64 pacientes (45%) que eram portadores de MRSA, foram obtidos 94 isolados deste microorganismo (tabela 3). Um paciente foi submetido a duas coletas para realização de culturas de vigilância. Na primeira coleta realizada, foi isolado um MRSA da lesão de pele. Quinze dias após, na segunda coleta realizada, foram isolados dois MRSA, sendo um de cavidade nasal e um da lesão de pele. Dois pacientes, que eram portadores de MRSA, retornaram à Enfermaria de Dermatologia em uma segunda internação, durante o período de estudo. No primeiro caso o período entre as coletas de vigilância foi de 28 dias. Foi obtido um isolado de MRSA da cavidade nasal na primeira internação e dois isolados de MRSA, um da lesão de pele e um da cavidade nasal na segunda internação. No segundo paciente, o período entre as coletas de vigilância foi de 14 dias e em ambas as internações foi obtido um isolado de cavidade nasal.

Todos os isolados de MRSA avaliados nesse estudo são provenientes de culturas de vigilância e, portanto, não há relação com episódios de infecção clínica.

Tabela 3 - Isolados de *S. aureus* resistente a oxacilina (MRSA), por pacientes portadores e sítios de colonização, na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, durante o período de seguimento de 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Nº de isolados por sítio de colonização por MRSA	Nº de Pacientes	Nº de isolados de cavidade nasal	Nº de isolados de lesão de pele
Somente um isolado de cavidade nasal	25	25	-
Somente um isolado de lesão de pele	11	-	11
Dois isolados, sendo um de cavidade nasal e um de lesão de pele	25	25	25
Três isolados, sendo um de cavidade nasal e dois de lesão de pele	1	1	2
Três isolados, sendo dois de cavidade nasal e um de lesão de pele	1	2	1
Dois isolados, ambos de cavidade nasal	1	2	-
Total	64	55	39

Entre os 64 pacientes classificados como portadores de MRSA, 39 (61%) eram positivos na primeira coleta realizada, e 25 (39%) foram identificados durante o seguimento, nas coletas posteriores. O número de pacientes avaliados na Enfermaria de Dermatologia, por período, durante o estudo, variou de 19 a 36. As características destes pacientes em relação ao estado de portador de MRSA estão descritas na tabela

4 e a comparação entre as taxas de portadores de MRSA detectados na primeira coleta e detectados durante o seguimento, está ilustrada no gráfico 1.

As informações obtidas dos prontuários médicos dos 142 pacientes podem ser observadas na tabela 5.

Tabela 4 - Pacientes admitidos na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, e número de pacientes portadores de *S. aureus* resistente a oxacilina, por mês, durante o período de seguimento de 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Período	31/05/05 a	30/06/05 a	29/07/05 a	27/08/05 a	25/09/05 a	24/10/05 a	Total
	29/06/05	28/07/05	26/08/05	24/09/05	23/10/05	21/11/06	
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	
Nº de pacientes admitidos na enfermaria	35	19	32	18	16	22	142
Nº de pacientes avaliados	35	27	36	24	19	27	-
Nº de pacientes portadores de MRSA	12	7	19	9	4	13	64
Nº de portadores detectados, na 1ª coleta, em 48h ou menos de internação	1	0	2	3	2	8	16
Nº de portadores detectados, na 1ª coleta, após 48h de internação	6	3	10	1	0	3	23
Nº de pacientes que se tomaram portadores durante o seguimento	5	4	7	5	2	2	25

Gráfico 1 - Proporção de pacientes portadores de *S. aureus* resistente a oxacilina na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, quanto ao momento de detecção deste microorganismo, durante o período de seguimento de 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Tabela 5 - Análise de características de 142 pacientes submetidos à pesquisa de portadores *S. aureus* resistente a oxacilina na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP, durante o período de seguimento de 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Características	Portadores (n=64)	Não Portadores (n=78)	Total (n=142)
Sexo masculino	28 (44%)	37 (47%)	65 (46%)
Idade (anos)			
Média (DP)	42,8 (21,8)	38,8 (25,7)	40,6 (24,0)
Mediana	42,0	35,0	40,0
Intervalo	1-84	0-92	0-92
Tempo de internação (dias)			
Média (DP)	24,3 (20,8)	15,4 (24,4)	19,4 (23,2)
Mediana	17,0	8,5	11,5
Intervalo	2-118	1-168	1-168
Tempo de internação prévio ao estado de portador (dias)			
Média (DP)	9,5 (1,04)	NA	NA
Mediana	6,0	NA	NA
Intervalo	0-49	NA	NA
Internação prévia nos últimos 12 meses	30 (47%)	25 (32%)	55 (39%)
No HC-FMUSP	18 (60%)	15 (60%)	33 (60%)
Uso prévio de antimicrobianos	38 (59%)	36 (46%)	74 (52%)
Doenças de base*			
Doenças atópicas	11 (17%)	10 (13%)	21 (15%)
Neoplasias	5 (8%)	9 (12%)	14 (10%)
Eritrodermia	8 (13%)	6 (8%)	14 (10%)
Doenças infecciosas	7 (11%)	8 (10%)	15 (11%)
Doenças auto-imunes	4 (6%)	8 (10%)	12 (8%)
Psoríase	6 (9%)	8 (10%)	14 (10%)
Doenças bolhosas	7 (11%)	3 (5%)	10 (7%)
Eczema	-	7 (9%)	7 (5%)
Pênfigo	15 (23%)	3 (5%)	18 (13%)
Outros	8 (13%)	21 (27%)	29 (20%)
Óbito	4 (6%)	1 (1%)	5 (4%)

DP: desvio padrão; NA: não se aplica; HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; * A soma será maior que 100%, pois alguns pacientes apresentam mais de uma doença.

Na primeira coleta, de *swab* nasal dos funcionários da Enfermaria de Dermatologia, no início do estudo, cinco (14%) de 37 foram positivos para MRSA, dos quais quatro eram auxiliares de enfermagem e um era do serviço de limpeza. Na segunda coleta, realizada no final do estudo, seis (18%) de 34 funcionários da enfermaria de dermatologia eram portadores de MRSA, dos quais três eram auxiliares de enfermagem, um era médico residente, um era estagiário e um era do serviço de limpeza. Entre os funcionários submetidos à pesquisa de portador de MRSA na EDER, quinze participaram das duas coletas, dos quais dois eram portadores de MRSA somente na primeira, um era portador somente na segunda, três eram portadores em ambas e nove não eram portadores em nenhuma das duas coletas. Em ambas as coletas, todos os funcionários da EDER que estavam em atividade no período, concordaram em participar do estudo.

4.1 Detecção do gene *mecA* e do gene da coagulase

Para detecção do gene *mecA* e, simultaneamente, do gene coagulase (*coa*), foi realizado PCR multiplex em todas as 105 amostras de MRSA identificadas fenotipicamente, sendo 94 isolados de pacientes e 11 de funcionários da Enfermaria de Dermatologia. Ambos os genes foram detectados em 101 isolados de MRSA (figura 2). Dois isolados de pele e dois isolados de cavidade nasal, obtidos de quatro pacientes, apresentaram somente o gene da coagulase e foram negativos para o gene *mecA*, apesar de apresentarem crescimento no teste de triagem utilizado na detecção de resistência a oxacilina.

Figura 2- PCR multiplex para detecção dos genes *mecA* (214bp) e *coa* (117bp) de amostras de *S. aureus* isolados na Enfermaria de Dermatologia (Hospital das Clínicas da FM-USP). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen®); canaletas 2 e 3: controle negativo (H₂O), canaletas 4 a 13: isolados de MRSA; canaleta 14: *S. aureus* ATCC 29213 (não portador do gene *mecA*); canaleta 15: *S. aureus* NCTC 10442 (portador do gene *mecA*); canaleta 16: controle positivo fornecido pelo kit (150 bp) para auxiliar a detecção de resultados falso negativos.

4.2 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Foram determinadas as CIM de onze antimicrobianos, pelo método da microdiluição em caldo, para todos os 105 isolados de MRSA. Todos os isolados foram sensíveis a vancomicina e resistentes a oxacilina e penicilina, incluindo os quatro isolados que não apresentaram o gene *mecA*.

Os isolados obtidos dos funcionários da Enfermaria de Dermatologia apresentaram valores de CIMs inferiores aos isolados obtidos dos pacientes, conforme demonstrado nas tabelas 6 e 7. Considerando-se os isolados de MRSA sensíveis a sulfametoxazol/ trimetroprima e a pelo menos mais quatro antimicrobianos testados, 52 (55%) de 94 obtidos de pacientes e 10 (91%) de 11 obtidos de funcionários apresentaram este perfil de sensibilidade.

Os quatro isolados de MRSA que não apresentaram o gene *mecA* foram resistentes a pelo menos sete dos onze antimicrobianos testados (tabela 8).

Em 25 dos 27 pacientes que eram colonizados por MRSA, em ambos os sítios pesquisados, os perfis de sensibilidade dos isolados de cavidade nasal e lesão de pele eram idênticos, enquanto em dois, esses perfis foram distintos.

Tabela 6 - Dados de sensibilidade a antimicrobianos de 94 isolados de *S. aureus* resistente a oxacilina obtidos de 64 pacientes portadores na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Agente Antimicrobiano	Sensível N (%)	Sensibilidade Intermediária N (%)	Resistente N (%)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	MIC _{mínimo} (µg/ml)	MIC _{máximo} (µg/ml)
Ciprofloxacina	39 (42)	2 (2)	53 (56)	16	128	≤0,25	>128
Clindamicina	52 (55)	1 (1)	41 (44)	≤0,25	>128	≤0,25	>128
Cloranfenicol	82 (87)	4 (4)	8 (9)	8	16	2	128
Eritromicina	14 (15)	3 (3)	77 (82)	>128	>128	≤0,25	>128
Gentamicina	35 (37)	-	59 (63)	64	>128	≤0,25	>128
Oxacilina	-	-	94 (100)	128	>128	4	>128
Penicilina	-	-	94 (100)	128	>128	8	>128
Rifampicina	73 (78)	18 (19)	3 (3)	≤0,25	2	≤0,25	128
Sulfametoxazol/ trimetoprima	52 (55)	-	42 (45)	≤4,75/ 0,25	608/ 32	≤4,75/ 0,25	>2432/ 128
Tetraciclina	60 (64)	28 (30)	6 (6)	1	8	≤0,25	32
Vancomicina	94 (100)	-	-	0,5	1	≤0,25	2

Tabela 7 - Dados de sensibilidade a antimicrobianos de 11 isolados de *S. aureus* resistente a oxacilina obtidos de funcionários portadores na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Agente	Sensível	Sensibilidade	Resistente	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC _{mínimo}	MIC _{máximo}
Antimicrobiano	N (%)	Intermediária N (%)	N (%)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Ciprofloxacina	10 (82)	-	2 (18)	<0,25	16	≤0,25	16
Clindamicina	10 (91)	-	1 (9)	≤0,25	<0,25	≤0,25	>128
Cloranfenicol	10 (91)	-	1 (9)	8	8	4	128
Eritromicina	6 (55)	-	5 (45)	<0,25	>128	≤0,25	>128
Gentamicina	6 (55)	-	5 (45)	1	>128	≤0,25	>128
Oxacilina	-	-	11 (100)	64	>128	8	>128
Penicilina	-	-	11 (100)	64	128	32	>128
Rifampicina	11 (100)	-	-	≤0,25	<0,25	≤0,25	1
Sulfametoxazol/ trimetoprima	10 (91)	-	1 (9)	≤4,75/ 0,25	<4,75/ 0,25	≤4,75/ 0,25	608/ 32
Tetraciclina	10 (82)	1 (9)	1 (9)	0,5	8	≤0,25	16
Vancomicina	11 (100)	-	-	0,5	1	0,5	1

Tabela 8 - Valores de Concentração Inibitória Mínima de 11 antimicrobianos, para 4 isolados de *S. aureus* resistente a oxacilina que foram negativos para o gene *mecA*, obtidos de 4 pacientes portadores na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Agente Antimicrobiano	Amostras			
	1*	2**	3*	4**
	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)
Ciprofloxacina	>128	64	64	16
Clindamicina	>128	>128	>128	>128
Cloranfenicol	8	8	8	64
Eritromicina	>128	>128	>128	>128
Gentamicina	>128	>128	>128	>128
Oxacilina	16	8	4	8
Penicilina	64	64	64	128
Rifampicina	1	1	1	1
Sulfametoxazol/ trimetoprima	608/ 32	608/ 32	304/ 16	304/ 16
Tetraciclina	8	16	16	≤0,25
Vancomicina	0,5	0,5	0,5	0,5

*MRSA isolado de cavidade nasal; **MRSA isolado de pele.

4.3 Determinação do tipo de SCC*mec*

Dos 101 isolados de MRSA que apresentaram o gene *mecA*, foi possível determinar o tipo de SCC*mec* de 97. Entre os 90 isolados de pacientes portadores de MRSA, 52 apresentaram SCC*mec* tipo IV, 34 apresentaram SCC*mec* tipo IIIA e não foi possível determinar o tipo de SCC*mec* de quatro isolados de MRSA que eram portadores do gene *mecA*. Dois destes foram isolados de lesões de pele de diferentes

pacientes e os outros foram obtidos de duas amostras clínicas de um mesmo paciente sendo uma da cavidade nasal e uma da lesão de pele.

Um paciente portador de MRSA *SCCmec* tipo IV na cavidade nasal, era colonizado na pele por um isolado de MRSA cujo tipo de *SCCmec* não foi possível determinar. Em um outro caso, foi isolado um *SCCmec* MRSA tipo IV na cavidade nasal, enquanto na pele, o isolado de MRSA apresentava *SCCmec* tipo IIIA. Os outros 25 dos 27 pacientes que eram colonizados por MRSA, em ambos os sítios pesquisados, os tipos de *SCCmec* dos isolados de cavidade nasal e lesão de pele, eram idênticos.

Entre os 11 isolados de funcionários portadores de MRSA, 10 apresentaram *SCCmec* tipo IV e um apresentou *SCCmec* tipo IIIA. Na figura 3 podem ser observados os perfis *SCCmec* apresentados por algumas amostras de MRSA.

Figura 3 - PCR multiplex para determinação do tipo de *SCCmec* em amostras de *S. aureus* isolados na Enfermaria de Dermatologia (Hospital das Clínicas da FM-USP). Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen®); canaleta 2: cepa NCTC 10442 (tipo I); canaleta 3: cepa N315 (tipo II); canaleta 4: cepa 85/2082 (tipo III), canaleta 5: cepa JSCS 1968 (tipo IV); canaletas 6 e 7: isolados apresentando *SCCmec* tipo IIIA; canaletas 8 e 9: isolados apresentando *SCCmec* tipo IV e canaleta 10: controle negativo (água destilada deionizada estéril).

4.4 Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Para realização da PFGE, as amostras foram agrupadas de acordo o perfil de sensibilidade e com o tipo de *SCCmec*. Todas as amostras de DNA dos 105 isolados de MRSA foram submetidas à PFGE. Dos 64 pacientes que eram portadores de MRSA, três eram portadores de dois isolados de MRSA com perfis de sensibilidade, DNA gerado pela PFGE e tipo de *SCCmec* distintos e ambos foram avaliados. Dos demais pacientes, que eram portadores de mais de um isolado de MRSA, foram obtidos resultados idênticos em todos os experimentos realizados, sendo avaliado somente um isolado de MRSA por paciente. No total, foram avaliados 78 perfis de DNA, sendo 67 isolados de amostras de pacientes e 11 de funcionários da EDER.

Dos 67 isolados de MRSA de amostras de pacientes, 36 apresentaram *SCCmec* tipo IV, 24 apresentaram *SCCmec* tipo IIIA, quatro não eram portadores do gene *mecA* e três eram portadores do gene *mecA* mas não foi possível determinar o tipo de *SCCmec*.

Analisando-se visualmente os perfis de DNA gerados por PFGE, foram obtidos 30 perfis diferentes distribuídos em sete tipos distintos (A – G). O gráfico 2 mostra a distribuição dos tipos de DNA obtidos na PFGE durante o período de estudo. A descrição dos perfis de DNA obtidos e os tipos de *SCCmec* estão apresentados na tabela 9.

Gráfico 2 - Tipos moleculares obtidos por eletroforese em campo pulsado, por mês, de 67 amostras de *S. aureus* resistente a oxacilina, obtidos de 64 pacientes portadores, na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

PFGE: eletroforese em campo pulsado.

Tabela 9 - Descrição dos tipos de SCCmec e tipos moleculares por em campo pulsado de 78 amostras de *S. aureus* resistente a oxacilina, obtidos de pacientes e funcionários portadores, na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Perfil PFGE	Tipo de SCCmec	Nº de isolados de pacientes	Nº de isolados de funcionários
A1	IV	6	1
A2	IV	2	-
A3	IV	1	-
A4	IV	1	-
A5	IV	1	-
A6	IV	1	-
A7	IV	1	-
A8	IV	-	1
A9	IV	1	-
A10	IV	2	-
B1	IV	9	3
B2	IV	-	1
C1	IV	4	-
C2	IV	4	-
C3	IV	-	3
C4	IV	1	1
C5	IV	1	-
C6	NT	3	-
D	IV	1	-
E1	IIIA	8	-
E2	IIIA	1	-
E3	IIIA	2	-
E4	IIIA	2	-
E5	IIIA	-	1
E6	IIIA	5	-
E7	IIIA	1	-
E8	NA	3	-
E9	NA	1	-
F	IIIA	3	-
G	IIIA	2	-

PFGE: eletroforese em campo pulsado; NT: isolados em que não foi possível determinar o tipo de SCCmec; NA: não se aplica (isolados não portadores do gene *mec A*).

Em resumo, entre os *SCCmec* tipo IV foram obtidas quatro diferentes linhagens (A -D). Entre os tipo IIIA foram obtidas três com predomínio absoluto de um (E), apresentado por 23 isolados de pacientes.

Nos três casos em que foi necessário avaliar duas amostras de MRSA obtidas de um mesmo paciente os perfis A2 e E8, B1 e C6, C2 e E6, foram apresentados pelos isolados de cada um dos pacientes respectivamente.

Dentre os 30 perfis de DNA obtidos na PFGE, os perfis B1 (n=12), E1 (n=8), A1 (n=7) e E6 (n=5) foram observados com maior frequência entre os isolados. A distribuição desses perfis durante o período de estudo está apresentada na tabela 10.

Os perfis de DNA obtidos na PFGE, apresentados pelos pacientes detectados portadores de MRSA na primeira coleta e por aqueles que se tornaram portadores desse microorganismo durante o seguimento, distribuídos quanto à ocorrência de internação prévia nos últimos 12 meses, estão apresentados na tabela 11.

Tabela 10 - Perfis moleculares obtidos por eletroforese em campo pulsado, por mês, observados com maior frequência entre 67 amostras de *S. aureus* resistente a oxacilina, obtidos de 64 pacientes portadores, na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

Perfil	31/05/05 a	30/06/05 a	29/07/05 a	27/08/05 a	25/09/05 a	24/10/05 a	Total
PFGE	29/06/05	28/07/05	26/08/05	24/09/05	23/10/05	21/11/06	
	I	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	
B1	2	3	3	-	1	-	9
E1	-	1	4	3	-	-	8
A1	-	-	3	2	-	1	6
E6	-	-	-	-	-	5	5
C1	-	-	1	1	2	-	4
C2	-	-	-	1	1	2	4
C6	-	-	2	-	1	-	3
E8	3	-	-	-	-	-	3
F	-	-	3	-	-	-	3

PFGE: eletroforese em campo pulsado.

Tabela 11 - Distribuição dos perfis de DNA obtidos por eletroforese em campo pulsado de amostras de *S. aureus* resistente a oxacilina, quanto à ocorrência de internação prévia nos últimos 12 meses e ao momento de detecção deste microorganismo, obtidos de pacientes portadores, na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

	Internação prévia nos últimos 12 meses	
	sim	não
Perfis PFGE de MRSA, isolados de portadores detectados na 1ª coleta, em 48h ou menos de internação	A1 (n=2)	A1 (n=1)
	A4 (n=1)	A10 (n=1)
	A7 (n=1)	C1 (n=1)
	A9 (n=1)	E4 (n=1)
	C1 (n=2)	E6 (n=1)
	C2 (n=1)	
	C6 (n=1)	
	E3 (n=1)	
Perfis PFGE de MRSA, isolados de portadores detectados na 1ª coleta, após 48h de internação	E4 (n=1)	
	A10 (n=1)	A1 (n=1)
	B1 (n=1)	A3 (n=1)
	D (n=1)	A5 (n=1)
	E1 (n=3)	B1 (n=2)
	E2 (n=1)	C1 (n=1)
	E7 (n=1)	C4 (n=1)
	F (n=1)	C5 (n=1)
		C6 (n=1)
		E6 (n=2)
		E8 (n=2)
		E9 (n=1)
Perfis PFGE de MRSA, isolados de pacientes que se tornaram portadores durante o seguimento	A1 (n=1)	A1 (n=1)
	A2 (n=1)	A2 (n=1)
	A6 (n=1)	B1 (n=5)
	B1 (n=1)	C2 (n=2)
	C2 (n=1)	C6 (n=1)
	E1 (n=3)	E1 (n=2)
	E6 (n=1)	E3 (n=1)
	E8 (n=1)	E6 (n=1)
	F (n=1)	F (n=1)
		G (n=2)

PFGE: eletroforese em campo pulsado.

A figura 4 mostra alguns perfis de DNA obtidos para isolados de portadores de SCC*mec* tipo IV. Na figura 5 são apresentados perfis de DNA obtidos de alguns isolados de MRSA portadores de SCC*mec* tipo IIIA.

A relação entre os tipos de SCC*mec*, perfis de sensibilidade aos antimicrobianos e tipagem molecular, está apresentada na tabela 12.

Figura 4 - Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de eletroforese em campo pulsado, utilizando-se a enzima de restrição *SmaI* em amostras de *S. aureus* isolados na Enfermaria de Dermatologia (Hospital das Clínicas da FM-USP)- canaletas 1 e 30: marcador de peso molecular 48,5Kb (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs); canaletas 2-4, 6-16, 21, 26-29: isolados de pacientes; canaletas 5, 17-20, 22-25: isolados de funcionários.

Figura 5 - Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de eletroforese em campo pulsado, utilizando-se a enzima de restrição *SmaI* em amostras de *S. aureus* isolados na Enfermaria de Dermatologia (Hospital das Clínicas da FM-USP)- canaleta 1: marcador de peso molecular 48,5Kb (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs); canaletas 2, 4-20: isolados de pacientes; canaleta 3: isolado de funcionário.

Tabela 12 - Relação entre os tipos de *SCCmec*, perfis de sensibilidade aos antimicrobianos e tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE) de 78 amostras de *S. aureus* resistente a oxacilina, obtidas de pacientes e funcionários portadores, na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FM-USP no período entre 31 de maio a 21 de novembro de 2005.

SCCmec tipo	Perfil de resistência aos antimicrobianos											PFGE tipo	nº de isolados
	OXA	VAN	PEN	ERI	CLI	GEN	TET	CIP	STX	RIF	CLO		
IV	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	A	2
	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	A	1
	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	A	2
	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	A	1
	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	A	9
	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	A	3
	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	B	1
	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	B	9
	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	B	1
	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	B	2
	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	C	2
	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	C	2
	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	C	2
	R	S	R	R	S	R	I	S	S	S	S	C	1
	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	C	2
	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	C	1
	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	C	4
	R	S	R	R	S	R	I	S	R	S	S	D	1
IIIA	R	S	R	R	R	R	I	R	R	I	S	E	7
	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	R	E	3
	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	E	1
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	E	1
	R	S	R	R	R	R	S	R	R	I	S	E	5
	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	E	2
	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	E	1
	R	S	R	R	R	R	I	R	R	I	S	F	2
	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	F	1
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	G	1
NA	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	G	1
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	E	2
	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	E	1
NT	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	E	1
	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	C	3
Total													78

OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; PEN: penicilina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; STX: sulfametoxazol - trimetoprima; RIF: rifampicina; CLO: cloranfenicol; NT: isolados em que não foi possível determinar o tipo de *SCCmec*; NA: não se aplica (isolados não portadores do gene *mec A*).

5. Discussão

O estudo demonstrou que houve uma proporção elevada de portadores de MRSA, na Enfermaria de Dermatologia, entre pacientes e funcionários desta enfermaria, o que é preocupante, visto que profissionais da saúde e pacientes podem representar uma importante fonte de disseminação deste microorganismo (Pittet & Waldvogel, 1997; Harbarth et al., 2006; Albrich e Harbarth, 2008). Durante os seis meses de estudo, uma proporção significativa dos pacientes portadores de MRSA, foi detectada na primeira coleta realizada (61%), incorrendo na possibilidade dos pacientes terem introduzido este microorganismo na enfermaria, a partir da comunidade ou de internações prévias, o que contribui na dificuldade de controlar a transmissão hospitalar de MRSA na Enfermaria de Dermatologia.

Entre os 39 isolados de MRSA da EDER, obtidos na primeira coleta realizada de cada paciente, 19 foram obtidos de amostras de pacientes que não haviam sido hospitalizados nos últimos 12 meses. No entanto, como até a 13ª semana do estudo as amostras eram coletadas apenas uma vez por semana, em apenas cinco dessas 19 amostras, a coleta foi realizada em até 48 horas após a internação do paciente na EDER, o que permite inferir uma maior possibilidade desses cinco isolados de MRSA serem de origem comunitária. Três desses isolados possuíam *SCCmec* tipo IV e perfis PFGE A1, A10 e C1, enquanto dois, possuíam *SCCmec* tipo IIIA e perfis PFGE E4 e E6. Esses perfis PFGE foram também apresentados por outros isolados de MRSA, obtidos de pacientes detectados portadores durante o seguimento ou ainda, pacientes que haviam sido internado nos últimos 12 meses, o que dificulta determinar a origem real desses isolados.

Os isolados relacionados à maioria das infecções causadas por CA-MRSA, relatadas na literatura, possuem *SCCmec* tipo IV. No Brasil foram relatados casos de infecções de pele e partes moles, adquirida na comunidade, todos causados por MRSA portadores de *SCCmec* tipo IV (Ribeiro et al., 2005, 2007). A prevalência de portadores de MRSA de origem comunitária, no Brasil, não é conhecida. Um estudo realizado em Goiânia, que pesquisou a presença de portadores de MRSA entre crianças menores de cinco anos com infecção do trato respiratório e meningite, relatou que sete de 686 crianças eram portadoras deste microorganismo. Os sete isolados de MRSA foram classificados como sendo de origem comunitária. No entanto, todos possuíam *SCCmec* tipo III que é descrito classicamente de origem hospitalar (Lamaro-Cardoso et al., 2007).

A transmissão cruzada de MRSA entre profissionais da saúde e pacientes é uma preocupação em instituições de saúde em todo o mundo. No entanto, medidas de controle eficazes permanecem controversas (Harbarth, et al. 2006). Na Enfermaria de Dermatologia do HC-FMUSP a transmissão hospitalar de MRSA pode ser bem caracterizada entre 25 pacientes internados, que se tornaram portadores desse microorganismo, somente durante o seguimento. Desses pacientes foram avaliados 28 isolados de MRSA, dos quais 14 possuíam *SCCmec* tipo IV e seis apresentaram o perfil observado com maior frequência durante o estudo (B1). A transmissão de isolados que possuíam *SCCmec* tipo IIIA também foi observada nesse grupo de pacientes. Cinco de 12 isolados de MRSA que tinham essa característica, apresentaram o perfil E1, que foi o mais prevalente entre os isolados multirresistentes. O perfil B1 foi detectado durante todo o estudo, com exceção do sexto período de seguimento dos pacientes internados na EDER, o que pode ser

explicado pelo fato de que no último período do estudo, 11 de 13 pacientes foram detectados portadores na coleta de admissão e o perfil B1 foi mais prevalente entre os pacientes que se tornaram portador de MRSA durante o seguimento. Após, na segunda coleta realizada entre os funcionários dessa enfermaria, o perfil B1 foi detectado em dois isolados de MRSA.

A transmissão cruzada de MRSA na EDER, também pode ser sugerida entre um funcionário e um paciente dos quais foram obtidos isolados de MRSA que apresentaram o perfil C4, além de sete pacientes e um funcionário, portadores de MRSA, que apresentaram o perfil A1. Entre isolados de MRSA que possuíam *SCCmec* tipo IIIA, os perfis E1 e E6 foram os mais frequentes, presente em oito e cinco isolados, obtidos de pacientes, respectivamente. Em ambos os perfis a transmissão cruzada entre pacientes pode ser sugerida, bem como entre pacientes dos quais foram obtidos isolados que apresentaram os perfis E8, F e G.

Das amostras de lesão de pele e de cavidade nasal de dois pacientes, foram obtidos isolados de MRSA distintos quanto ao perfil de sensibilidade, tipo de *SCCmec* e perfil PFGE. Ambos os pacientes foram detectados portadores de MRSA durante o seguimento. No primeiro, foi detectado um isolado portador de *SCCmec* tipo IV e perfil B1, na cavidade nasal. Na lesão de pele, o isolado de MRSA apresentou o perfil C6 e *SCCmec* não determinado. No segundo paciente, o isolado de cavidade nasal apresentou de *SCCmec* tipo IV e perfil C2, enquanto na amostra de MRSA, isolada da lesão de pele, foi observado o perfil E6 e *SCCmec* tipo IIIA. De um paciente que era portador de um isolado que apresentou o perfil E8 (não portador do gene *mecA*) na primeira semana do estudo, três semanas após foram obtidos

isolados portadores de SCC*mec* tipo IV (perfil A2) um da cavidade nasal e um da lesão de pele.

Além da transmissão cruzada, também foram observadas situações, em que a maior probabilidade foi a do paciente ter sido admitido na EDER portador de MRSA, principalmente entre 16 pacientes em que o isolado foi obtido de amostras coletadas em menos de 48 horas após a internação. No entanto, 11 haviam sido hospitalizados previamente. Esses pacientes representam uma fonte de transmissão importante de MRSA. Foram obtidos 11 perfis de DNA gerados pela PFGE entre os isolados de MRSA desses pacientes, dos quais seis foram observados em outros pacientes. Quatro desses isolados possuíam SCC*mec* tipo IIIA, 11 eram portadores de SCC*mec* tipo IV e um não foi possível determinar o tipo de SCC*mec*.

A identificação fenotípica dos portadores de MRSA foi realizada com técnicas de baixo custo, de execução simples e que não necessitam de equipamentos especiais. São técnicas que podem empregadas nos laboratórios de microbiologia clínica dos centros de saúde e assim serem úteis na detecção dos MRSA e no desenvolvimento de estratégias para diminuir a transmissão deste microorganismo no hospital e na comunidade.

Houve 100% de correlação entre o teste de triagem, realizado para identificar fenotipicamente os isolados de *S. aureus* resistentes a oxacilina, e os valores das CIMs encontradas para este antimicrobiano, ambos experimentos padronizados pelo CLSI. No entanto, das 105 amostras estudadas quatro não apresentaram o gene *mecA*, apesar de serem resistentes a oxacilina. É provável que esses quatro isolados apresentem outros mecanismos de resistência a oxacilina tais como hiperprodução de

beta-lactamase e modificações nas proteínas de ligação da penicilina (PBPs). Esses mecanismos são menos frequentes e conferem resistência a oxacilina não relacionada à presença do gene *mecA*, a resistência *borderline*, em que os valores das CIMs de oxacilina estão próximos aos pontos de corte. Os isolados que apresentam esses mecanismos são conhecidos como BORSA (*borderline oxacillin-resistant S. aureus*) ou MODSA (*modified penicillin-binding protein S. aureus*) (Tomasz et al., 1989; Jorgensen, 1991; Nadarajah et al. 2006). Foi observado um caráter de multirresistência aos antimicrobianos nesses quatro isolados de MRSA que não eram portadores do gene *mecA*. O emprego de técnicas moleculares baseadas em sequenciamento poderá ser oportuno para uma melhor caracterização desses isolados.

Os isolados de MRSA da EDER demonstraram boa correlação entre tipo de *SCCmec* e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Todos os 35 isolados de MRSA que eram portadores de *SCCmec* tipo IIIA eram resistentes a pelo menos sete dos 11 antimicrobianos testados, enquanto todos os 62 isolados que apresentaram *SCCmec* tipo IV eram sensíveis a pelo menos cinco dos 11 antimicrobianos testados. A sensibilidade desses isolados ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima (STX) foi um bom marcador fenotípico do tipo de *SCCmec*. Todos os isolados sensíveis a esse antimicrobiano apresentaram *SCCmec* tipo IV e todos os isolados que eram portadores de *SCCmec* tipo IIIA eram resistentes a STX. Somente um isolado, que apresentou um perfil de DNA não relacionado a nenhum *cluster* na PFGE (perfil D), era portador de *SCCmec* tipo IV e resistente a STX. Os isolados de MRSA, em que não foi possível determinar o tipo de *SCCmec* (perfil C6 na PFGE), foram sensíveis a oito dos 11 antimicrobianos testados mas foram resistentes a STX.

Esses isolados podem ter sofrido alguma mutação genética ou podem possuir *SCCmec* tipo V, visto que a PCR multiplex realizada para determinar o tipo de *SCCmec* detecta somente os tipos I, II, III e IV. Além da resistência de 100% dos isolados aos antimicrobianos penicilina e oxacilina, eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina e clindamicina também apresentaram índices de resistência elevados de 81%, 61%, 50% e 41% respectivamente, limitando as opções terapêuticas para o tratamento de infecções provocadas por esses isolados de MRSA.

A realização de coletas de vigilância para detecção de pacientes colonizados por MRSA, em conjunto com outras medidas como aumento na adesão aos padrões de higiene e isolamento de contato dos portadores podem ser úteis no controle da transmissão hospitalar desse microorganismo. No entanto, a efetividade de tais medidas permanece controversa. (Cooper et al., 2004) O tempo necessário para detecção dos portadores de MRSA, utilizando métodos clássicos, pode ser superior a 48 horas, o que pode limitar a efetividade das medidas de controle da transmissão. Uma possibilidade interessante seria emprego de técnicas rápidas de identificação como a PCR e a utilização de meios cromogênicos. No entanto, o custo dessas técnicas é elevado.

Não são relatados benefícios adicionais quando são realizados regimes de descolonização de MRSA, triagem de profissionais do cuidado a saúde e interdição de departamentos onde são identificados grandes *clusters* de MRSA entre pacientes (Harbarth, et al. 2006). Na EDER, foi caracterizada a colonização transitória entre os funcionários portadores de MRSA dessa enfermaria. Dos cinco portadores de MRSA detectados no início do estudo, três eram também portadores desse microorganismo

no final do estudo. No entanto, em dois deles, os isolados MRSA obtidos um no início e outro no fim do estudo, pertenciam a tipos diferentes. O único funcionário portador de isolados idênticos (perfil C3) era encarregado da limpeza e não mantinha contato direto com os pacientes. O perfil C3 foi detectado em outro funcionário, mas nenhum paciente apresentou esse perfil.

A PFGE, a determinação do tipo de *SCCmec* e a caracterização fenotípica demonstraram ser instrumentos úteis no auxílio à compreensão da transmissão cruzada de MRSA na EDER.

6. Conclusões

- A prevalência de pacientes portadores de MRSA na EDER foi de 45%.
- Foi observada a transmissão hospitalar cruzada de MRSA entre pacientes e funcionários da EDER.
- A colonização por MRSA, dos profissionais de cuidado à saúde da EDER, foi transitória.
- A transmissão hospitalar foi caracterizada em 39% dos pacientes portadores de MRSA.
- Pode ter ocorrido admissão de pacientes portadores de MRSA, na EDER.
- Foram detectados isolados MRSA portadores de *SCCmec* tipoIV e *SCCmec* tipo IIIA.
- Não foi possível determinar o tipo de *SCCmec* em 4 amostras que eram portadoras do gene *mecA*.
- O gene *mecA* não foi detectado em 4 amostras.
- Os isolados sensíveis a sulfametoxazol-trimetoprima e a mais quatro classes de antimicrobianos apresentaram *SCCmec* tipoIV.
- Os isolados multirresistentes eram portadores *SCCmec* tipoIIIA.
- Através da análise do perfil de DNA foi possível observar quatro linhagens portando *SCCmec* tipo IV e outras três linhagens de MRSA, em que a maior parte dos isolados, eram portadores de *SCCmec* tipo IIIA.

7. Anexos

Anexo A – Soluções e Reagentes

Tampão EC

Tris 6mM	1,5ml de Tris 1M pH8,0
	1,5ml de Tris 1M pH7,0
EDTA 0,1M	5,0ml de EDTA 0,5M pH8,0
	5,0ml de EDTA 0,5M pH7,0
NaCl 1M	29,22g
Brij58 0,5%	2,5g
Desoxicolato de sódio 0,2%	1,0g
Sarkosyl 0,5% (N-Lauroilsarcosina, sal sódico)	2,5g

Ajustar o pH para 7,5, completar o volume para 500ml com água destilada deionizada e esterilizar por filtração.

Tampão ES

EDTA 0,4M, pH9,3	40,0ml de EDTA 625mM pH9,3
Sarkosyl 1%	10,0ml de sarkosyl a 5%

Preparar no momento do uso em quantidade suficiente.

Tampão CHEF-TE

Tris 0,1M pH7,5	2,5ml de Tris 1M pH8,0
	2,5ml de Tris 1M pH7,0
EDTA 0,1M pH7,5	5,0ml de EDTA 0,5M pH8,0
	5,0ml de EDTA 0,5M Ph7,0

Completar o volume para 50,0ml com água destilada deionizada e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Tampão DNS

Tris 0,1M pH8,0	5,0ml de Tris 1M pH8,0
Cloreto de magnésio 5mM	0,25ml de cloreto de magnésio 1M

Completar com água destilada deionizada estéril para 50ml. Preparar no momento do uso.

Agarose de baixo ponto de fusão a 2%

Agarose de baixo ponto de fusão	2g
Água destilada deionizada	100ml

Dissolver a agarose em água destilada deionizada em banho de água fervente e aliquotar em frascos contendo 10mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos e armazenar a 5°C.

Proteinase K

Dissolver 100mg de proteinase K (GibcoBRL, Life Technologies, USA) em 10mM de Tris HCl pH7,5, 20mM de cloreto de cálcio e 50% de glicerol. Armazenar a temperatura de -20°C.

Lisostafina**Solução estoque de lisostafina**

Dissolver 1mg de lisostafina em 1ml de tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5. Armazenar a temperatura de -20°C.

Solução de uso de lisostafina

Diluir a solução estoque 1:10 em tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5.

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE)**TBE 10×**

Tris base	121,1g
Ácido bórico	61,8g
Na ₂ EDTA	3,7g

Completar o volume com água destilada deionizada para 1000mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos e armazenar a temperatura ambiente.

TBE 0,5×

TBE 10×	50mL
Água destilada deionizada	950mL

Preparar no momento do uso.

Anexo B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**(paciente)**

Existe uma bactéria chamada *Staphylococcus aureus* que pode habitar a nossa pele e mucosas sem o aparecimento de nenhum sintoma. Porém ela também pode causar diversas doenças, algumas vezes, muito graves.

Por apresentar feridas na pele, os pacientes da enfermaria de dermatologia apresentam uma chance maior de adquirir essa bactéria e também de transmiti-la aos outros.

A razão principal para este estudo é avaliar a transmissão desta bactéria na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas.

Será solicitada a você permissão para a coleta de material com uso de swab, é um tipo de cotonete, que será aplicado na pele e na mucosa nasal. Um profissional treinado fará esta coleta sem nenhum risco para você. O material colhido será estudado no nosso laboratório.

O maior conhecimento que se obterá com este estudo não favorecerá diretamente a você, mas ajudará a estabelecer estratégias que ajudem a controlar a transmissão desta bactéria.

A recusa em participar deste estudo não trará qualquer prejuízo no seu atendimento, já que haverá o mesmo tipo de assistência com a mesma equipe e com a mesma atenção.

Uma vez aceite participar deste estudo, em qualquer momento você poderá suspender sua participação sem alteração na assistência médica.

Usaremos dados pessoais seus como idade, mas o sigilo será garantido e você não terá seu nome divulgado de qualquer forma.

Declaro que compreendi e estou ciente sobre informações descritas acima.

São Paulo, __ de _____ de 200

Assinatura do sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Dúvidas: Farm. Renata Pacheco 11 83548098 ou
GCIH 11 30697066 ramal 03

**Anexo C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(funcionário)**

Existe uma bactéria chamada *Staphylococcus aureus* que pode habitar a nossa pele e mucosas sem o aparecimento de nenhum sintoma. Porém ela também pode causar diversas doenças, algumas vezes, muito graves.

Por apresentar feridas na pele, os pacientes da enfermaria de dermatologia apresentam uma chance maior de adquirir essa bactéria e também de transmiti-la aos outros.

A razão principal para este estudo é avaliar a transmissão desta bactéria na Enfermaria de Dermatologia do Hospital das Clínicas.

Será solicitada a você permissão para a coleta de material com uso de *swab* que será aplicado na mucosa nasal. Um profissional treinado fará esta coleta sem nenhum risco para você. O material colhido será estudado no nosso laboratório.

O maior conhecimento que se obterá com este estudo não favorecerá diretamente a você, mas ajudará a estabelecer estratégias que ajudem a controlar a transmissão desta bactéria.

A recusa em participar deste estudo não trará qualquer inconveniente à sua pessoa.

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

O sigilo será garantido e você não terá seu nome divulgado de forma alguma.
Declaro ter compreendido as informações acima.

São Paulo, __ de _____ de 200

Assinatura do sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

8. Referências

Albrich WC, Harbarth S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infect Dis*. 2008; 8:289-301.

Ben-David D, Mermel LA, Parenteau S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. *Am J Infect Control*. 2008; 36:93-7.

Bhattacharya D, Carleton H, Tsai CJ, Baron E J, Perdreau-Remington F. Differences in Clinical and Molecular Characteristics of Skin and Soft Tissue Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates between Two Hospitals in Northern California. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1798-803.

Borer A, Gilad J, Yagupsky P, Peled N, Porat N, Trefler R, Shprecher-Levy H, Riesenber K, Shipman M, Schlaefter F. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Institutionalized Adults with Developmental Disabilities. *Emerging Infect Dis*. 2002; 8: 966-70.

Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: S344-9.

Branger C, Gardye C, Galdbart JO, Deschamps C, Lambert N. Genetic Relationship between Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from France and from International Sources: Delineation of Genomic Groups. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2946-51

Bukharie HA, Abdelhadi MS, Saeed IA, Rubaish AM, Larb, EB. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 40: 1-4.

Caiaffa Filho HH, Lima MP, Sinto SI, Andriolo A, Mendes C.M.F. Avaliação da sensibilidade a teicoplanina e vancomicina, em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa*. *Rev Assoc Bras*.1994; 40: 77-80.

Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect Dis*. 2001; 7: 178-182.

Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing*. Document M100–S17. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2007.

Cooper Bs, Stone Sp, Kibbler Cc, Cookson Bd, Roberts Ja, Medley Gf, Duckworth G, Lai R, Ebrahim S. Isolation Measures in the Hospital Management of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Systematic Review of the Literature. *Brit Med J*. 2004; 329: 533-8.

Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The Impact of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Bacteremia on Patient Outcomes: Mortality, Length of Stay, and Hospital Charges. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005; 26:166-74.

Crossley KB, Archer GL editors. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill-Livingstone, 1997.

Das I, O'Connell N, Lambert P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. *J Hosp Infect*. 2007; 65: 117-23

Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, Boyle-Vavra S. Novel Methicillin-Resistance Cassette in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates of Diverse Genetic Backgrounds. *J Infect Dis*. 2002; 186: 1344-7.

Duarte CO, 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.

Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*– an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16: 103–24.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 7687-92.

Farrington M, Redpath C, Trundle C, Coomber S, Brown NM.. Winning the battle but losing the war: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection at a teaching hospital. *Q. J. M.* 1998; 91: 539–48.

Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore C, Day NPJ. How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol.* 2003; 185: 3307–16.

Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J Clin Microbiol.* 2002; 2766-71.

Fey PD, Saïd-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 196-203.

Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, Schrenzel J. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 254-60.

Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D, Schrenzel J. Evaluation of Three Molecular Assays for Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2011-13.

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

Gordon RJ, Lowy FD Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: S350-9

Harbarth S. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-recent advances and future challenges. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:1154-62.

Harbarth S, Masuet-Aumatell C, Schrenzel J, Francois P, Akakpo C, Renzi G, Pugin J, Ricou B, Pittet D. Evaluation of rapid screening and pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care: an interventional cohort study. *Crit Care*. 2006; 10:R25

Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H. Mechanisms of methicillin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Ballière's Clin Infect Dis*. 1999; 5:221-42.

Ito T, Hiramatsu K.. Acquisition of Methicilin Resistance and Progression of Multiantibiotic Resistance in Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*. 1998; 39: 526-33.

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.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 2637-51.

Jernigan JA, Titus MG, Gröschel DH, Getchell-White S, Farr BM. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Epidemiol*. 1996; 143: 496-504.

Jorgensen JH. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1991;12: 14-9.

Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2002; 51: 126-32.

Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect*. 1999; 43: 33-37.

King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin and Soft-Tissue Infections. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 309-17.

Killgore GE, Holloway B, Tenover FC. A 5' Nuclease PCR (TaqMan) High-Throughput Assay for Detection of the *mecA* Gene in Staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2516-9.

Kluitmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 505-20.

Kluitmans J, Wertheim HF. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: and prevention of nosocomial infections. *Infection.* 2005; 33: 3-8.

Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL, Jernigan DB. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations, United States. *Emerging Infect Dis.* 2005; 11: 868-72.

Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, McDougal LK, Chaitram J, Jensen B, Fridkin SK, Killgore G, Tenover FC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis.* 2006; 193:172-9.

Lamaro-Cardoso J, Castanheira M, de Oliveira RM, e Silva SA, Pignatari AC, Mendes RE, Pimenta FC, Andrade AL. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57: 467-70.

Lee YL, Cesario T, Pax A, Tran C, Ghouri A, Thrupp LD. Nasal colonization by *Staphylococcus aureus* in active, independent, community seniors. *Age Ageing.* 1999; 28:229-32.

Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ. Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patient-screening swabs. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3187-91.

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

Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, Lope L, Benaderet S, Buela F, Vincentino W, Albini M, Bertaux O, Constenla I, Bagnulo H, Llosa L, Ito T, Hiramatsu K. Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerging Infect Dis*. 2005; 11: 973-6.

Miller R, Esmail H, Peto T, Walker S, Crook D, Wyllie D. Is MRSA admission bacteraemia community-acquired? A case control study. *J Infect*. 2008; 56:163-70.

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.

Murray PR; Baron EJ; Pfaller MA; Tenover FC; Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999.

Nadarajah J, Lee MJ, Louie L, Jacob L, Simor AE, Louie M, McGavin MJ. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol*. 2006; 55:1675-83.

National Committee for Clinical Laboratory Standards.. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7–A5. 5.ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004 Dec; 32(8):470-85.

Nishijim S, Ohshima S, Higashida T, Nakaya H, Kurokawa I.. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from impetigo patients between 1994 and 2000. *Int J Dermatol*. 2003; 42: 23–25.

NISHIJIMA S, KUROKAWA I. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from skin infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2002; 19: 241-3.

O'Brien FG, Pearman JW, Gracey M, Riley TV, Grubb WB. Community Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involved in a Hospital Outbreak. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 2858-62.

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4289-94.

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.

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.

Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2001; 5: 163-70.

Parras F, Guerrero MC, Bouza E, Blázquez MJ, Moreno S, Menarguez MC, Cercenado E. Comparative Study of Mupirocin and Oral Co-Trimoxazole plus Topical Fusidic Acid in Eradication of Nasal Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 175-9.

Pfaller MA. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. In: Iseberg HD. editor. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington: American Society for Microbiology, 1993.

Pittet D; Waldvogel FA. To control or not to control colonization with MRSA ... that's the question! *QJM*. 1997; 90: 239-41.

Pujol M, Peña C, Pallares R, Ariza J, Ayats J, Dominguez MA, Gudiol F. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med.* 1996; 100: 509-16.

Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1985-8.

Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, Del Peloso PF, da Costa Ferreira Leite C, Teixeira LA, Figueiredo AM. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect. Dis.* 2007; 59: 339-45.

Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2429-33.

Ridenour GA, Wong ES, Call MA, Climo MW. Duration of Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Patients in the Intensive Care Unit: Implications for Intervention. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27:271-8.

Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* in New York city hospitals. *Emerging Infect Dis.* 1999; 5: 9-17.

Safdar N, Narans L, Gordon B, Maki DG. Comparison of Culture Screening Methods for Detection of Nasal Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Prospective Study Comparing 32 Methods. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:3163–6.

Safdar N, Marx J, Meyer NA, Maki DG. Effectiveness of preemptive barrier precautions in controlling nosocomial colonization and infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit. *Am J Infect Control.* 2006; 34:476-83

Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am J Med*. 2008; 121:310-5.

Saiman L, Cronquist A, Wu F, Zhou J, Rubenstein D, Eisner W, Kreiswirth BN, Della-Latta P. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 24:317-21.

Salgado, CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis*. 2003; 36:131-9

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, v.3, p.B.23, B.24, E.5., 1989.

Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect Dis*. 2001; 7:323-326.

Singh K, Gavin PJ, Vescio T, Thomson Jr RB Jr, 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; 41: 2755-7.

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.

Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:1869-74.

Trindade PDA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS. Prevalence of SCC_{mec} Type IV in Nosocomial Bloodstream Isolate of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3435-7.

Tverdek FP, Crank CW, Segreti J. Antibiotic Therapy of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Critical Care. *Crit Care Clin.* 2008; 24: 249-60.

Wertheim HF, Verveer J, Boelens HA, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1465-7.

Yoshida R, Kuwahara-Arai. K, Baba T, Cui L, Richardson JF, Hiramatsu K. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob. Chemother.* 2003; 51:247-55.