MARIA APARECIDA CURSINO

**Avaliação do desempenho de diferentes sítios de culturas de
vigilância para *Staphylococcus aureus* em gestantes e
recém-nascidos**

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

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara
Shafferman Levin

São Paulo

2012

MARIA APARECIDA CURSINO

**Avaliação do desempenho de diferentes sítios de culturas de
vigilância para *Staphylococcus aureus* em gestantes e
recém-nascidos**

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

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara
Shafferman Levin

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cursino, Maria Aparecida

Avaliação do desempenho de diferentes sítios de culturas de vigilância para
Staphylococcus aureus em gestantes e recém-nascidos / Maria Aparecida Cursino. --
São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Anna Sara Shafferman Levin.

Descritores: 1.Vigilância epidemiológica 2.Controle de infecções 3.Infecção
hospitalar 4.*Staphylococcus aureus* 5.*Staphylococcus aureus* resistente à metilina
6.Gestantes 7.Recém-nascido

USP/FM/DBD-254/12

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me mostrado que era possível, ter colocado anjos no meu caminho, ter aberto portas onde eu não esperava, nos momentos em que mais precisei.

Agradeço à Dra Anna Sara Levin, a quem admiro muito. Serei eternamente grata por ter acreditado em mim, pelo incentivo constante, por tudo o que aprendi e pelo quanto cresci trabalhando com você! Muito obrigada por tudo, Anna!

À Cilmara Polido, minha amiga e companheira de projeto, com quem dividi momentos de felicidade, frustrações e realizações. Seja por telefone, emails sem sentido ou telepatia! Cil, sou grata por tudo e muito feliz por tê-la conhecido!

À Dra. Silvia Figueiredo, que por vezes foi minha orientadora, médica e conselheira e esteve sempre presente, sempre disposta a ouvir e ajudar. Obrigada pelo voto de confiança ao me aceitar no LIM, pelo respeito e carinho como sempre trata a todos.

À Juliana Ferraz Rosa, minha companheira de projeto, minha professora e amiga querida, desde o primeiro dia em que cheguei ao LIM.

À Roseli Antonia, que foi o primeiro dos anjos com quem encontrei ao entrar na FMUSP, que me apresentou ao LIM, me abriu as portas da faculdade e me ajudou em tudo sempre.

Aos amigos do LIM: alunos, estagiários e funcionários, que estiveram sempre presentes e me acompanharam nesta trajetória, com quem aprendi muito e tive o prazer de conviver durante estes anos.

Aos meus familiares e amigos de fora do LIM, que souberam aceitar a minha ausência e não me esqueceram, mesmo que eu os tenha trocado pelas cepas de *S. aureus*.

E por último, mas de maneira alguma menos importante, eu agradeço de todo o coração à minha família e ao meu namorado, que foram base, apoio, motivação e me trouxeram até aqui. Meu pai, sempre meu melhor amigo! Minha mãe que absorve todos os meus medos, meu irmão que me faz querer ser melhor sempre e meu namorado que sabe ser irmão, amigo e está sempre ao meu lado sem nunca me cobrar. Tudo isso é por vocês!

*“Two roads diverged in a wood, and I--
I took the one less travelled by,
And that has made all the difference.”*
Robert Frost

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
3. MÉTODOS	14
3.1 Obtenção dos isolados	15
3.2 Definição de paciente colonizado (gestante ou RN)	16
3.2.1 Gestante colonizada por <i>S. aureus</i> :	16
3.2.2 Recém-nascido colonizado por <i>S. aureus</i>	16
3.2.3 Gestante colonizada por MRSA	17
3.2.4 Recém-nascido colonizado por MRSA	17
3.2.5 Gestante colonizada por MSSA	17
3.2.6 Recém-nascido colonizado por MSSA	18
3.3 Métodos microbiológicos	18
3.3.1 Detecção do gene <i>mecA</i> e do gene da coagulase	19
3.3.1.1 Extração do DNA genômico.	20
3.3.1.2 Reação de amplificação.	20
3.3.1.3 Eletroforese	21
3.3.2 Determinação do espectro de resistência a agentes antimicrobianos	21
3.3.2.1 Preparo da solução estoque do antimicrobiano	22
3.3.2.2 Número de diluições	22
3.3.2.3 Preparo das diluições na microplaca	22
3.3.2.4 Preparo da suspensão bacteriana	23
3.3.2.5 Inoculação da suspensão bacteriana	23
3.3.2.6 Leitura das CIMs	23
3.4 Análise de dados	23
3.4.1 Caracterização dos pacientes colonizados	23
3.4.2 Análise descritiva dos dados	26
3.4.3 Análise da positividade dos sítios de coleta	26

3.4.4	Determinação dos fatores associados à colonização nasal por <i>S. aureus</i>	27
4.	RESULTADOS	28
4.1	Caracterização da população de estudo	28
4.2	Positividade dos sítios de coleta para cultura de vigilância de <i>S. aureus</i>	32
4.3	Fatores associados à colonização nasal por <i>S. aureus</i>	38
4.4	Características microbiológicas dos isolados	47
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Esquema demonstrando os componentes das classes de complexo *mec* existentes em *S. aureus* (Adaptado de LIM, 2002) _____ 3
- FIGURA 2 – Esquema de SCC*mec*, tipos I ao VII em MRSA, apresentando os principais elementos que os compõem. Adaptado de Deurenberg, 2009 _____ 3
- FIGURA 3 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MSSA em 191 gestantes submetidas a parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade _____ 30
- FIGURA 4 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MRSA em 15 gestantes submetidas a parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade _____ 31
- FIGURA 5 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MSSA em 147 recém-nascidos de parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade _____ 32
- FIGURA 6 – Positividade dos sítios de coleta de cultura de vigilância para MRSA em 34 recém-nascidos de parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade _____ 33

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Características gerais de 392 gestantes submetidas a parto hospitalar, avaliadas quanto a colonização por *S. aureus* (fevereiro/2009 a janeiro/2010) _____ 26
- TABELA 2 – Características gerais de 382 RN de parto hospitalar avaliados para colonização por *S. aureus* (fevereiro/ 2009 a janeiro/2010) _____ 28
- TABELA 3 – Positividade de diferentes sítios de cultura de vigilância para *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e resistente a meticilina (MRSA) em gestantes e recém-nascidos do Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro/2009-Janeiro/2010) _____ 34
- TABELA 4 – Frequência de perfis de positividade de sítios de cultura de vigilância para *S. aureus* em gestantes e recém-nascidos de parto hospitalar do Hospital das Clínicas de São Paulo. (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010) _____ 35
- TABELA 5 – Comparação das características gerais das gestantes colonizadas por MSSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) com gestantes colonizadas em outros sítios anatômicos, mas não nas narinas. (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010) _____ 36
- TABELA 6 – Comparação das características gerais das gestantes colonizadas por MRSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) com gestantes colonizadas em outros sítios anatômicos, mas não nas narinas. (Fevereiro 2009 - Janeiro 2010) _____ 37
- TABELA 7 – Características dos recém-nascidos de parto hospitalar com colonização nasal por MSSA (associada ou não a outros sítios) em comparação com aqueles colonizados por MSSA apenas em sítios extranasais. (Fev/2009 – Jan/2010) _____ 38
- TABELA 8 – Características dos RN de parto hospitalar colonizados por MRSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) em

comparação com aqueles colonizados por MRSA apenas em
sítios extranasais. (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010) _____ 40

TABELA 9 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana de 49 isolados MRSA
testados por microdiluição em caldo para determinação da
concentração inibitória mínima (CIM), provenientes de culturas
de vigilância de gestantes e RN de parto hospitalar do Hospital
das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010) __43

RESUMO

Cursino M. A. Avaliação do desempenho de diferentes sítios de culturas de vigilância para *Staphylococcus aureus* em gestantes e recém-nascidos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: a coleta de culturas de vigilância é uma das estratégias utilizadas no controle de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, especialmente *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Estas culturas são utilizadas para determinar portadores assintomáticos e prevenir a disseminação do patógeno para outros pacientes através da tomada de medidas de isolamento do portador. Neste contexto, tem-se demonstrado que a descolonização de portadores pode reduzir o risco de infecções estafilocócicas em certas ocasiões. O sítio anatômico mais comumente analisado são as narinas anteriores, mas continuamos a nos questionar se seria necessária a cultura de outros sítios anatômicos para este fim. **Objetivos:** este estudo objetivou avaliar o desempenho de diferentes sítios de cultura de vigilância em determinar a colonização de gestantes e recém-nascidos (RN) e determinar os fatores associados a colonização nasal por *S. aureus*. **Metodologia:** este é um estudo descritivo, desenvolvido no Hospital das Clínicas de São Paulo, Brasil, um hospital terciário universitário. Os pacientes envolvidos no estudo são gestantes durante trabalho de parto e seus recém-nascidos. A coleta de material de seu em quatro sítios anatômicos para os recém-nascidos: narinas anteriores, orofaringe, períneo e umbigo, no momento do parto, no terceiro dia e semanalmente. Para as gestantes, foram coletados quatro sítios anatômicos: narinas anteriores, anus, períneo e orofaringe. Apenas a primeira cultura positiva foi considerada, os pacientes colonizados nas narinas foram comparados àqueles colonizados apenas em sítios extranasais e os fatores de risco para colonização por *S. aureus* foram determinados. **Resultados:** foram incluídas 392 gestantes e 382 recém-nascidos. A colonização materna por *S. aureus* foi 53% (MSSA 49% e MRSA 9%). A colonização de RN foi 47% (MSSA 39% e MRSA 9%). Entre os RN, o melhor sítio de coleta foi o umbigo (64% para MSSA e 68% para MRSA) e a melhor associação foi narinas anteriores mais umbigo (86% para MSSA e 91% para MRSA). Entre as gestantes o melhor sítio foi narinas anteriores (MSSA 59% e MRSA 67%) e a melhor associação de sítios foi narinas anteriores mais orofaringe (83% para MSSA e 80% para MRSA). Dentre os fatores de risco, apenas o número de moradores na mesma residência foi associado à colonização materna por *S. aureus* ($2,0 \pm 0,6$ vs $3,6 \pm 1,8$; $p: 0,04$). **Conclusão:** nosso estudo confirma a necessidade da coleta de vários sítios para assegurar a sensibilidade das culturas de vigilância. Não há fatores associados a colonização nasal que distinguem portadores nasais dos colonizados em sítios extranasais. Os programas de controle de infecção baseados em culturas de vigilância nasal podem ser comprometidos.

Descritores: 1.Vigilância epidemiológica 2.Controle de infecções 3.Infecção hospitalar 4.*Staphylococcus aureus* 5.*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina 6.Gestantes 7.Recém-nascido

SUMMARY

Cursino M. A. Performance evaluation of different body sites to surveillance cultures of *Staphylococcus aureus* in pregnant women and newborns [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Introduction: Surveillance cultures are one of the strategies used to control *Staphylococcus aureus* infections, especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). These cultures are used to determine asymptomatic carriers and prevent spread of the organism to other patients by putting carriers under isolation precautions. Also some authors demonstrated that decolonization of carriers can reduce the risk of staphylococcal infections under certain conditions. The most commonly cultured body sites are the anterior nares but the challenge remains to determine whether routine culturing of other body sites is necessary. **Objectives:** the study objective to evaluate the performance of surveillance cultures at various body sites in determining *S.aureus* colonization in pregnant women and their newborns (NB) and determine factors associated with nasal colonization. **Methods:** This is a descriptive study, developed on "Hospital das Clinicas, São Paulo, Brazil", a tertiary-care university hospital. Patients enrolled: pregnant women during labor and their newborns. Material collection: For NB four sites were evaluated: nares, oropharynx, perineum and umbilical stump at birth, 3rd day and weekly. For pregnant women four sites during labor: anterior nares, anus, perineum and oropharynx. Only the first positive culture was considered. Nasally colonized patients were compared with colonized only extra-nasally and risk factors to *S. aureus* colonization were determined. **Results:** 392 pregnant women and 382 NB were included. *S. aureus* colonization was 53% among pregnant women (MSSA 49% and MRSA 4%). *S. aureus* colonization among NB was 47% (MSSA 39% and MRSA 9%). For NB patients, the best body site was the umbilical stump (64% for MSSA and 68% for MRSA). The best combination in NB was nares plus umbilical stump (86% for MSSA and 91% for MRSA). Among pregnant women, the best body site was the anterior nares (MSSA 59% and MRSA 67%). The best combination was nares plus oropharynx, (83% for MSSA and 80% for MRSA). Only the smaller number of household members was associated with MRSA carriage in pregnant women (2.2 ± 0.6 vs 3.6 ± 1.8 ; $p: 0.04$). **Conclusion:** Our study confirms the need for multiple culture sites to assure sensitivity. No features distinguish nasal carriers from only extra-nasal colonized people. Control programs relying mainly on nasal surveillance cultures may be compromised.

Descriptors: 1.Epidemiological Surveillance 2.Infection control 3. Cross infection 4. *Staphylococcus aureus* 5.Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 6.Pregnant women 7.Newborn

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo divididas em dois grandes grupos: *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva, cujo principal representante é *S. aureus*.

S. aureus é uma bactéria gram-positiva esférica não esporulada em formato de cocos com cerca de 1µm de diâmetro, que ocorre em aglomerados microscópicos com formato semelhante a cachos de uvas. É anaeróbia facultativa, ou seja, cresce pela respiração aeróbica ou fermentativa, neste caso produzindo ácido láctico. Coloniza em geral as vias nasais, podendo ser encontrada regularmente em vários outros locais, incluindo pele, cavidade oral e trato gastrointestinal.

Indivíduos saudáveis são normalmente portadores de *Staphylococcus aureus*, pois este microrganismo faz parte da microbiota. Mais de 30% dos humanos são persistentemente colonizados por *S. aureus* e mais de 70% sofrem colonização intermitente, mantendo-se assintomáticos. Todavia, *S. aureus* é um patógeno oportunista e, dadas as necessárias circunstâncias, pode causar diversas infecções (STAPLETON, 2007; O'BRIEN, 2009).

As infecções causadas por *S. aureus* incluem infecções de pele e tecidos moles (hordéolos, foliculites, piodermites, impetigo, furúnculos e abscessos), pneumonia, mastite, doenças toxinogênicas (síndrome estafilocócica da pele escaldada ou doença de Ritter, síndrome estafilocócica do choque tóxico), osteomielite, endocardite e bacteremia. Pode causar também intoxicação alimentar, pela produção de enterotoxinas (KLEVENS, 2007).

S. aureus é capaz de manifestar diversas proteínas associadas à virulência que possibilitam a infecção do tecido hospedeiro. Os fatores de

virulência são mediados por um sistema central de genes reguladores acessórios (*agr*) que controlam a sua expressão (GILOT, 2004).

O sistema *agr* é normalmente descrito como tendo dupla ação, a de reprimir a transcrição de proteínas de membrana celular e ativar exoproteínas durante a fase pós-exponencial. Duman *et al*, identificaram 104 genes que são “up-regulated” e 34 “down-regulated” pelo sistema *agr* de acordo com a concentração celular (SAKOULAS, 2003; DUNMAN, 2001).

Há cerca de quinze outros sistemas acessórios envolvidos na expressão de proteínas relacionadas à virulência em *S. aureus*, como *sae* (“*S. aureus* exoprotein expression”), *ssrAB* (“*Staphylococcal respiratory response*”), *ArlSR* (“*Autolysis-related locus*”), *LytRS*, *sarA* e homólogos de *sarA*, entre outros, um esquema complexo ainda não totalmente estudado e compreendido (PRAGMAN, 2004; SIBBALD, 2006).

Antimicrobianos β -lactâmicos e resistência

Além dos fatores de virulência, *S. aureus* é capaz de desenvolver mecanismos de resistência intrínseca e adquirida a diversos agentes antimicrobianos.

A resistência de *S. aureus* a meticilina ou oxacilina ocorre através da produção de β -lactamases ou pela expressão do gene *mecA*, ou ainda por ambos os mecanismos (KHAN, 2007).

As células estafilocócicas são rodeadas por uma estrutura em malha, com 20 a 40nm de espessura, chamada parede celular de peptideoglicano, composta por uma série de pequenas cadeias alternadas de ácido N-acetilmurâmico e resíduos N-acetilglicosamina. Estas cadeias são unidas entre si por uma pentaglicina, através de uma ligação chamada ligação cruzada (STAPLETON, 2007).

A ligação cruzada ou transpeptidação ocorre na superfície externa da parede celular em uma reação catalisada por proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Os β -lactâmicos agem a partir de sua ligação a estas proteínas, inibindo a formação do peptideoglicano e, conseqüentemente

causando desestruturação da parede e a morte da bactéria (STAPLETON, 2007).

O gene *mecA* em *S. aureus* é responsável por codificar uma enzima ligadora de penicilinas, chamada PBP2a ou PBP2', pela qual os β -lactâmicos possuem baixa afinidade. Dessa forma, o microrganismo torna-se resistente a ação da meticilina e a todos os demais β -lactâmicos (penicilinas, penicilinas resistentes a penicilinases, aztreonam, carbapenens, cefalosporinas) (VIDAL, 2009).

Atualmente, são descritas 5 classes de complexo *mec*, de acordo com a organização genética da unidade regulatória do gene *mecA* (região *mecR1-mecI*). Em *S. aureus* existem apenas 3 delas: as classes A, B e C, que possui duas variantes, C1 e C2 (MILHEIRIÇO, 2007), como visto na Figura 1.

Figura 1 – Esquema demonstrando os componentes das classes de complexo *mec* existentes em *S. aureus*. Adaptado de LIM, 2002.

O complexo *mec* é parte de uma extensa região, um elemento móvel conhecido como “staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)”, formado por dois componentes genéticos essenciais: o complexo *mec* e o complexo *ccr*. O restante do DNA presente neste elemento é denominado região “J” (*junkyard* em inglês), sem função conhecida (VIDAL, 2009).

Há onze tipos de SCC*mec* (I a XI), descritos e classificados de acordo com seu tamanho e conteúdo, pelo tipo de “cassette chromosome recombinase” (*ccr*) e a classe do complexo *mec* que eles possuem (SHORE,

2011). Os componentes relacionados aos tipos I a VII podem ser visto na Figura 2.

Figura 2 – Esquema de SCCmec, tipos I ao VII em MRSA, apresentando os principais elementos que os compõem. Adaptado de Deurenberg, 2009.

A mobilidade atribuída a SCCmec é, em parte, devida a presença do complexo *ccr*, que codifica enzimas recombinases das famílias invertase/resolvase. Na presença de *ccrA* e *ccrB*, SCCmec pode ser incorporado ou excluído do cromossomo, daí atribuir-se a presença deste gene a mobilidade de SCCmec (TRINDADE, 2005).

Histórico da resistência estafilocócica a meticilina

A meticilina foi introduzida na prática clínica em 1959 e apenas dois anos depois, em 1961, Jevons demonstrou haver cepas estafilocócicas que apresentavam resistência aos β -lactâmicos (JEVONS, 1961). Durante os anos seguintes, isolados MRSA foram encontrados em diversos países da Europa e espalharam-se, tornando-se o maior patógeno responsável por infecções hospitalares em muitos países pelo mundo (HALLIN, 2007).

De acordo com a teoria multiclone elaborada por Enright *et al*, utiliza-se mundialmente a classificação das cepas MRSA em clones. Um clone MRSA é definido como um grupo de cepas de mais de um país que têm

perfil alélico (em inglês, “sequence type” - ST) e tipo de *SCCmec* idênticos (ENRIGHT, 2002).

A primeira cepa MRSA isolada no Reino Unido em 1960 se disseminou pelo mundo nessa década e é conhecida atualmente como clone arcaico (NCTC10442). Após este clone, em 1982, uma cepa MRSA (N315) foi isolada no Japão, esse clone foi chamado Clone Nova Iorque/Japão e também alcançou distribuição mundial. Três anos depois, em 1985, uma cepa MRSA (85/2082) foi encontrada na Nova Zelândia e desde o começo dos anos 90, diversos clones disseminaram-se pelo mundo. (DEURENBERG, 2008).

O clone endêmico brasileiro (BEC, em inglês, “Brazilian endemic clone”) encontra-se disseminado por todo o território nacional, além de outros países da América Latina e Europa. Este clone possui multirresistência a agentes antimicrobianos, como oxacilina, penicilinas, clindamicina, eritromicina, gentamicina, espectinomicina e tetraciclina (OLIVEIRA, 2002) e *SCCmec* tipo III.

Até a década de 90 havia registros da presença de MRSA apenas em ambiente hospitalar (HA-MRSA – “hospital acquired *Staphylococcus aureus*”), porém em 1982 foi registrada a primeira ocorrência de MRSA em pacientes que não tiveram contato com ambiente hospitalar. Estas cepas são chamadas CA-MRSA (“community acquired *S. aureus*”) e estão relacionadas a infecções de pele e tecidos moles, infecção sanguínea, choque séptico e pneumonia necrosante, entre outros (ROSSNEY, 2007).

Cepas CA-MRSA são encontradas em pacientes que não tiveram exposição ao ambiente hospitalar nem sofreram infecções prévias por *S. aureus*. Este tipo de infecção ocorreu inicialmente entre indígenas, prisioneiros, usuários de drogas intravenosas, atletas, militares e homossexuais (MORAN, 2006) e hoje se encontra disseminado pela população.

Quando comparadas, CA-MRSA tende a apresentar resistência a um menor espectro de agentes antimicrobianos e produzir toxinas diferentes de HA-MRSA (MORAN, 2006). Sugere-se que há cepas CA-MRSA mais

virulentas que as HA-MRSA devido à presença da toxina PVL. Esta toxina tem a capacidade de provocar citólise nas células mononucleares e polimorfonucleares e causar a morte celular por necrose ou apoptose. Consiste de duas proteínas que atuam em sinergismo, a LukS-PVL e a LukF-PVL, codificadas pelos genes *pvl*, *lukS* e *lukF* (ROSSNEY, 2007).

Entretanto, há estudos que indicam a ocorrência de cepas de alta virulência que não expressam a proteína PVL, outros estudos demonstram baixa prevalência de PVL em isolados de CA-MRSA (VON EIFF, 2004; BELKUM, 2009). Há ainda certas discordâncias sobre o papel desta toxina na virulência de *S. aureus*, sendo necessários mais estudos a respeito.

De qualquer forma, o observado por Holzkecht et al é que há uma mudança recente na epidemiologia de MRSA e nota-se, nos últimos anos, a redução da incidência deste patógeno no ambiente hospitalar, devido a uma série de medidas de controle e erradicação e o aumento de sua incidência na comunidade, com aumento da mortalidade e dos custos relacionados (HOLZKNECHT, 2010).

***Staphylococcus aureus* não resistentes a metilina**

Após conhecer e estudar a resistência das cepas MRSA, pode-se imaginar que toda a importância clínica relacionada a estes microrganismos não se aplique às cepas suscetíveis a metilina, o que é um engano.

S. aureus suscetível a metilina pode ser resistente a outras classes de antimicrobianos. Além disso, possui sistema *agr* ativo e é capaz de produzir inúmeros fatores de virulência, como enterotoxinas, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1, sigla em inglês) e leucocidina de Panton-Valentine (PVL, sigla em inglês), o que pode desencadear quadros clínicos tão graves quanto as infecções por MRSA (LAYER, 2006).

Estudos comprovam que MRSA e MSSA possuem o mesmo potencial de colonizar e de causar doenças (LAYER, 2006). Um estudo realizado na Espanha demonstrou que as pneumonias bacterianas por

MRSA e MSSA têm a mesma mortalidade no hospital onde foi desenvolvido o estudo (GONZÁLEZ, 1999).

Portanto, um paciente infectado por MRSA ou MSSA pode ter a vida ameaçada se a terapia certa não for empregada e a escolha médica torna-se extremamente delicada ao se tratar de infecções estafilocócicas, especialmente quando se considera a rápida evolução do quadro clínico, muitas vezes levando o paciente a óbito.

O portador e culturas de vigilância

A identificação do agente infeccioso é importante para se determinar a terapia correta a ser empregada quando a infecção bacteriana já está instalada, mas também quando se pretende prevenir novos casos de infecção. Nestes casos, realizam-se culturas de vigilância, ou seja, rotineiramente é realizada a coleta de amostras dos pacientes admitidos na unidade de saúde com o intuito de identificar, isolar e, se necessário, descolonizar o paciente antes que ele sofra qualquer procedimento invasivo ou entre em contato com outros pacientes.

A disseminação hospitalar de estafilococos resistentes ou não a meticilina ocorre através de pacientes e profissionais de saúde chamados portadores sãos que, apesar de assintomáticos, transportam a bactéria sob o risco de desenvolver infecções endógenas ou transmitir a infecção para outros profissionais ou pacientes (DAR, 2006).

Na comunidade, ou seja, fora do ambiente hospitalar, os portadores assintomáticos também trabalham como vetores da disseminação de MRSA e aumentam ainda mais a ocorrência do microrganismo em ambiente hospitalar assim que dão entrada no hospital como pacientes, visitantes ou até como profissionais de saúde (CARDOSO, 2007).

Diversos autores sugerem a realização de coletas de vigilância a fim de se evitar a transmissão e identificar indivíduos colonizados por *S. aureus* na unidade de saúde, tanto profissionais quanto pacientes, com o objetivo de se reduzir a ocorrência de infecção relacionada a assistência em saúde

(IRAS) por MRSA, já que os custos de um paciente com IRAS são muito maiores do que os de um paciente não infectado (JERNIGAN, 1996; KARCHMER, 2002; ROSENTHAL, 2006).

Da mesma forma, sabe-se que a realização de culturas de vigilância como parte da rotina do controle de infecção no hospital representa um gasto considerável de recursos. Começa aí uma discussão sobre o assunto, onde são discutidos custos, tempo, efetividade e segurança.

Estimou-se que cada US\$1,00 gasto com culturas de vigilância ativa gera a economia de US\$10,00 no sistema de saúde, quando comparados dois surtos por MRSA ocorridos em UTI neonatais (KARCHMER, 2002).

De qualquer forma, a redução de custos com análises é sempre importante, portanto o ideal é estabelecermos um sítio de coleta, ou uma associação de sítios que seja capaz de detectar os casos de colonização com boa positividade e gastos mínimos.

Atualmente, diversos sítios anatômicos podem ser utilizados na coleta de material de culturas de vigilância para a pesquisa de colonização por *S. aureus*, como nasal, oral, anal, perianal, axilar, perineal, umbilical, material de ferida aberta, entre outros. O estudo organizado por Jernigan *et al*, indica que os locais mais frequentes de colonização por MRSA são narinas (88%), umbigo (56%), virilha (50%) e axila (31%) (JERNIGAN, 1996).

O principal sítio de colonização por *S. aureus* são as narinas anteriores. A maioria dos programas de triagem de MRSA realiza apenas coletas nasais e não incluem coletas de orofaringe, por acreditar que pacientes colonizados na orofaringe sejam também colonizados nas narinas pela proximidade dos sítios. Além disso, a coleta de orofaringe é desconfortável para o paciente e gera custos adicionais em análise (MERTZ, 2007).

Porém, diversos estudos têm citado a necessidade de se atribuir a coleta de material de orofaringe para detecção de *S. aureus*, especialmente quando se observa a reincidência de colonização em pacientes que

sofreram descolonização nasal, o que pode ser atribuído a colonização de orofaringe (NILSSON, 2006; MERTZ, 2007).

Quando se trata de pacientes adultos há um número considerável de registros, porém quando se trata de realizar culturas de vigilância para *S. aureus* em recém-nascidos (RN), o que se tem é muito pouco.

Um estudo dirigido determinou que, para RN, o sítio de coleta nasal seria suficiente, sendo capaz de detectar 97% das amostras positivas de culturas de vigilância para *S. aureus* (SINGH, 2003).

Já outro estudo indicou a coleta de “swabs” anais para aprimorar a detecção de RN colonizados por MRSA, embora ainda assim os resultados da associação não sejam significativos. Enquanto isso, outro estudo indicou a associação de “swabs” nasais e umbilicais para este fim, o que corrobora com estudos que afirmam que o umbigo de RN é reservatório para *S. aureus* (BACK, 1996; ROSENTHAL, 2006).

Segundo Rosenthal, a variação encontrada entre estudos para os valores de coleta nasal pode ser associada à persistência da colonização que, neste sítio, é maior que nos outros testados. Há ainda a possibilidade de haver diferença entre a colonização por CA-MRSA e HA-MRSA, que podem ter sítios de preferência diferentes. Há ainda diferenças nas técnicas de amostragem e variações na definição de paciente colonizado, que podem interferir nos resultados apresentados (NILSSON, 2006; ROSENTHAL, 2006).

Em 1991, nos países nórdicos e na Holanda desenvolveu-se uma estratégia de triagem rigorosa seguida da erradicação, através da descolonização, dos portadores de *S. aureus*. Esta estratégia é chamada “search and destroy” e tem sido responsabilizada pela constante redução na incidência de MRSA nos países em que foi adotada (HOLZKNECHT, 2010).

Esta estratégia é baseada na coleta de culturas de vigilância e, até que se tenham os resultados das culturas, o paciente é mantido em isolamento assim que hospitalizado, esta parte é chamada de “search”, ou seja, procura. Se colonizado por MRSA, o paciente continua em isolamento

e é tratado para que o patógeno seja erradicado, ou seja, a etapa de “destroy”, que consiste na descolonização do paciente (WERTHEIM, 2004).

Associada a estratégia de descolonização, há a política de restrição ao uso de antibióticos, que seguem os “guidelines” holandeses. A partir desta restrição, a seleção de microrganismos resistentes, inclusive *S. aureus*, exercida pela pressão dos antibióticos é menor, ou seja, tem-se uma prevalência muito menor de cepas resistentes que os demais países europeus, mesmo que vizinhos (WERTHEIM, 2004).

Deteção de *S. aureus* em culturas de vigilância

A detecção de *S. aureus* em culturas de vigilância pode ser realizada de diversas maneiras, desde os métodos de cultura clássicos até metodologias de tipagem molecular de última geração.

A metodologia convencional consiste na cultura de células em meios de cultura clássicos como ágar sal manitol, ágar sangue de carneiro para isolamento de colônias características e sua identificação através de provas bioquímicas, como coagulase, catalase, coloração de Gram e DNase.

Há ainda técnicas mais novas de identificação como ágar seletivos para MRSA (MRSASelect, CHROM Agar MRSA, MRSA ID), técnica de aglutinação em látex para detecção de proteína A e fator de coagulação, detecção de PBP2a, que apresentam boa sensibilidade e especificidade e tempos de resposta intermediários entre as metodologias tradicional e molecular.

Dentre as tecnologias moleculares empregadas, utilizam-se as baseadas em PCR, onde se identifica a bactéria por amplificação de seu material genético e detecção de genes característicos. Dentre estas metodologias baseadas em PCR, há ainda o “PCR-Real time”, com capacidade de geração de resultados em cerca de duas a quatro horas de análise, o que pode economizar muito o tempo necessário para a obtenção dos resultados, sendo essencial em determinados casos (VAN HAL, 2007; ADALETI, 2008; FRENCH, 2009).

Em contrapartida, o custo das técnicas moleculares é cerca de seis vezes maior que as metodologias clássicas, que por sua vez necessitam de pelo menos 48 horas para liberar os seus primeiros resultados (VAN HAL, 2007).

Há diversos estudos desenvolvidos para comparar as técnicas moleculares e tradicionais. Neste sentido, realizou-se em 2009 uma revisão da literatura e concluiu que a evidência para a efetividade clínica da triagem rápida por PCR é inconclusiva por diversos fatores (TACCONELLI, 2009).

Há citações de que alguns métodos de detecção rápida por PCR geram resultados falsos positivos com maior frequência que a metodologia tradicional. Um estudo aponta que o enriquecimento da amostra em caldo para posterior análise no meio seletivo MRSA *Select* Agar apresenta resultados estatisticamente equivalentes aos do PCR (mesma sensibilidade), em maior tempo (18 horas), porém com menor custo (WOLK, 2009).

O principal argumento para a utilização dos métodos de detecção rápida de MRSA é a redução dos casos de infecção e a consequente redução dos gastos com cuidados ao paciente, que superaria os investimentos com a metodologia. Porém, no estudo desenvolvido por French, assim como em outros estudos citados por ele, não houve redução na transmissão ou infecção por MRSA que possa ser associada a metodologia de PCR, mas sim a um programa de melhorias que não inclui métodos de triagem rápida (FRENCH, 2009).

Atualmente na rotina clínica, os métodos fenotípicos mais aceitos para detecção de MRSA incluem disco difusão de oxacilina, ágar de triagem incorporado com oxacilina, determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de oxacilina por diluição em caldo e E-teste. Destes, o mais utilizado é o de disco difusão de oxacilina, ou como recentemente indicado pelo Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI, sigla em inglês), o de disco difusão de cefoxitina (ADALETI, 2008).

Com relação aos meios seletivos, diversos estudos têm testado sua aplicação e os melhores resultados são encontrados quando estes meios

são utilizados em amostras de origem nasal. Quando “swabs” de outras fontes são analisados, há perda de sensibilidade (VAN HAL, 2007).

Enfim, acredita-se que nenhuma metodologia de coleta e análise disponíveis atualmente é isoladamente suficiente para fornecer informações plenamente confiáveis dentro do que se espera para a tomada de ações em saúde pública. Para isso, é necessária a harmonização dos programas de vigilância e o aperfeiçoamento das técnicas de genotipagem (STRUELENS, 2009).

De maneira geral, cabe ao laboratório avaliar a sua realidade e decidir pela metodologia a ser aplicada, levando-se em consideração o investimento que se deseja fazer, a origem das amostras que foram analisadas e a possibilidade de aguardar respostas em um intervalo de tempo um pouco maior.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos principais:

- Avaliar o desempenho de diversos sítios de culturas de vigilância na determinação da colonização por *S. aureus* em gestantes e recém-nascidos;
- Avaliar os fatores associados a colonização nasal de recém-nascidos e gestantes por *S. aureus*;

Através dos resultados obtidos, objetiva-se orientar a prática clínica quanto à otimização do processo de coleta de amostras para a identificação de portadores *S. aureus* em ambiente hospitalar, especificamente em berçários e UTI neonatais.

A hipótese testada é a de que o sítio nasal das gestantes e RN é suficiente para identificar os portadores sãos nesta população de estudo, com confiabilidade suficiente para que seja desnecessário obter culturas de outros sítios.

3. MÉTODOS

Localizado na cidade de São Paulo, o complexo hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (HCFMUSP), conta com 2200 leitos, distribuídos entre seis institutos especializados, dois hospitais auxiliares, uma divisão de reabilitação e um hospital associado.

O HCFMUSP é uma Autarquia Estadual, vinculada administrativamente à Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo e associada à Universidade de São Paulo para fins de ensino, pesquisa e prestação de serviços de saúde à comunidade.

Dentre as várias unidades que compõem o Hospital das Clínicas, encontram-se os Laboratórios de Investigação Médica (LIMs), uma estrutura composta por 62 Unidades Laboratoriais. Estas Unidades, vinculadas aos Departamentos da FMUSP, possuem as seguintes finalidades:

- Desenvolver pesquisa científica;
- Padronizar novas técnicas e métodos de diagnóstico possibilitando sua implantação para atendimento de pacientes em outras unidades do HC;
- Promover a formação de pesquisadores em pesquisa básica e aplicada;
- Servir de campo de ensino e treinamento de estudantes de escolas de nível superior, cujos currículos sejam relacionados com as ciências da saúde;
- Servir de campo de desenvolvimento e treinamento para profissionais da saúde;
- Realizar cursos no campo da medicina e da saúde.

O berçário e a Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) neonatal do HCFMUSP são unidades de acolhimento para recém-nascidos (RN) provenientes de gestações de alto risco, que incluem gestantes portadoras

de comorbidades e condições psicossociais importantes, que ofereçam risco às gestantes, à gestação ou ao RN. Essas unidades atendem um número de aproximadamente 170 RN por mês.

Este estudo faz parte de um projeto prévio mais amplo, cujas amostras já foram coletadas no berçário do Hospital das Clínicas de São Paulo, no período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2010, com o objetivo de determinar os fatores associados à aquisição de *S. aureus* resistente a oxacilina (MRSA) por RN de parto hospitalar. De acordo com a estratégia de amostragem utilizada, foram coletadas amostras de diversos sítios anatômicos de cerca de 400 RN e suas mães.

As amostras coletadas estão armazenadas no banco de cepas do LIM 54 – Laboratório de Bacteriologia do HCFMUSP, em freezer a -80°C, devidamente identificadas e caracterizadas para que estejam disponíveis a outros estudos e foram utilizadas para desenvolver o estudo proposto, a fim de determinar o desempenho dos sítios de cultura empregados, tanto em RN quanto em gestantes para *S. aureus*, MRSA e MSSA.

A pesquisadora executante deste estudo participou ativamente do período de coletas, sendo responsável pela análise, identificação, emissão de resultados e armazenamento das amostras obtidas destas coletas no LIM 54.

3.1 Obtenção dos isolados

A coleta de material dos recém-nascidos (RN) foi realizada no momento do nascimento – preferencialmente na sala de parto, após estabilização do paciente, ou na chegada do RN ao berçário – e três dias após o nascimento, quando recebem alta do hospital. Os bebês que permaneceram sob cuidados por um período maior que três dias, foram coletados semanalmente até a alta hospitalar ou até a quarta semana, o que acontecesse primeiro. Os dias de coleta para gestante e bebê foram identificados como zero (momento do parto), três, sete, quatorze e depois semanalmente.

A coleta de material das gestantes foi realizada no dia do nascimento do RN, ainda na sala de parto e, quando possível, nos demais dias de internação, quando a gestante fosse mantida em processo de amamentação.

As amostras dos pacientes foram coletadas pela técnica de “swabbing”, que consistiu na coleta de material biológico através de um “cotonete” estéril (swab) para cada sítio anatômico de cada paciente. As amostras das gestantes foram coletadas no dia do parto em quatro sítios: narina anterior (N), anal (A), períneo (P) e orofaringe (O). As amostras dos RN foram obtidas nos seguintes sítios anatômicos: narina anterior (N), orofaringe (O), perianal (P) e coto umbilical (U).

3.2 Definição de paciente colonizado (gestante ou RN)

3.2.1 Gestante colonizada por *S. aureus*:

Foi considerada “colonizada por *S. aureus*” a gestante que, em um ou mais sítios, apresentou positividade para *S. aureus* (MRSA ou MSSA). Eventualmente, houve coletas subsequentes das gestantes que estavam em amamentação. Nesta situação, consideramos positivo o caso em que, em algum momento ou sítio, apresentou positividade para *S. aureus*.

Foi considerada “não colonizada por *S. aureus*” a gestante que, até o momento da alta hospitalar, apresentou ausência de colonização por *S. aureus* (MRSA ou MSSA) em todos os sítios e dias de coleta.

3.2.2 Recém-nascido colonizado por *S. aureus*

Foi considerado “colonizado por *S. aureus*” o recém-nascido que, em algum momento ou sítio, apresentou positividade para *S. aureus* a partir da coleta do 3º dia.

Desta forma, foi considerado “não colonizado por *S. aureus*”, o recém-nascido que apresentou ausência de colonização por *S. aureus* (MRSA ou MSSA) em todos os sítios e coletas a partir do 3º dia.

Foram desconsideradas as amostras de dia 0 dos recém-nascidos, para que pudéssemos excluir a possibilidade de relatarmos eventos de colonização transitória por contato com secreções da gestante no momento do parto. Neste caso, o recém-nascido que apresentou colonização por *S. aureus* apenas no momento do parto (dia 0) e ausência de colonização nas demais amostras, foi considerado não colonizado.

3.2.3 Gestante colonizada por MRSA

Foi considerada “colonizada por MRSA” a gestante que, em um ou mais sítios, apresentou positividade para MRSA apenas.

Dessa forma, foi considerada “não colonizada por MRSA” a gestante que, até o momento da alta hospitalar, apresentou ausência de colonização por MRSA em todos os sítios e dias de coleta.

3.2.4 Recém-nascido colonizado por MRSA

Foi considerado “colonizado por MRSA” o recém-nascido que, em um ou mais sítios, apresentou positividade para MRSA apenas, a contar a partir da coleta do 3º dia.

Desta forma, foi considerado “não colonizado por MRSA”, o recém-nascido que apresentou ausência de colonização por MRSA em todos os sítios e coletas a partir do 3º dia.

Assim como nos casos de colonização por *S. aureus*, as amostras de dia 0 dos recém-nascidos foram desconsideradas, portanto o recém-nascido que apresentou colonização por MRSA apenas no momento do parto (dia 0) e ausência de colonização nas demais amostras foi considerado não colonizado por MRSA.

3.2.5 Gestante colonizada por MSSA

Foi considerada “colonizada por MSSA” a gestante que, em um ou mais sítios, apresentou positividade para MSSA apenas.

Assim, foi considerada “não colonizada por MSSA” a gestante que, até o momento da alta hospitalar, apresentou ausência de colonização por MSSA em todos os sítios e dias de coleta.

3.2.6 Recém-nascido colonizado por MSSA

Foi considerado “colonizado por MSSA” o recém-nascido que, em um ou mais sítios, apresentou positividade para MSSA apenas, a contar a partir da coleta do 3º dia.

Desta forma, foi considerado “não colonizado por MSSA”, o recém-nascido que apresentou ausência de colonização por MSSA em todos os sítios e coletas a partir do 3º dia.

Assim como nos casos de colonização por *S. aureus*, as amostras de dia 0 dos recém-nascidos foram desconsideradas, portanto o recém-nascido que apresentou colonização por MSSA apenas no momento do parto (dia 0) e ausência de colonização nas demais amostras foi considerado não colonizado por MSSA.

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram colonização concomitante por MRSA e MSSA no mesmo momento de coleta. Estes pacientes não foram considerados em nenhuma das análises de colonização.

3.3 Métodos microbiológicos

As coletas foram realizadas com “swabs” estéreis, conforme descrito anteriormente, e armazenadas em meio de transporte Stuart até a sua entrega no laboratório para análise no mesmo dia da coleta (MURRAY, 1999).

Os “swabs” foram adicionados ao meio de cultura líquido, caldo infusão cérebro e coração (BHI), para enriquecimento da amostra e incubados a 37°C por 24 horas. Após incubação foram semeados em ágar sal-manitol e incubados a 35°C por até 48 horas. *Staphylococcus aureus*

fermentam manitol formando colônias de características sugestivas deste microrganismo (SINGH, 2003).

Após o período de incubação, as colônias características foram repicadas e isoladas em ágar-sangue de carneiro e incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias características obtidas em ágar sangue foram submetidas à coloração de Gram e aos testes de catalase e DNase para identificação fenotípica presuntiva (MIR, 1998). O controle de qualidade foi realizado utilizando-se a cepa ATCC® 29213.

Os isolados de *Staphylococcus aureus* identificados foram submetidos ao teste de triagem para detecção de resistência a oxacilina em ágar Mueller-Hinton contendo 4% de cloreto de sódio e 6mg/L de oxacilina (SINGH, 2003). O controle de qualidade foi realizado utilizando-se as cepas ATCC® 29213 (sensível) e NCTC® 10442 (resistente).

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

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

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

Para a detecção dos gene *mecA*, foi utilizado o um conjunto de *primers* para PCR multiplex, sintetizados pela Invitrogen® (Carlsbad, California), de acordo com o utilizado por KEARNES, *et al.* (1999), como se segue: SA-1 (5' CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA 3') e SA-2 (5' CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT 3'), SA-3 (5' GTA GAT TGG GCA ATT ACA TTT TGG AGG 3') e SA-4 (5' CGC ATC AGC TTT GTT ATC CCA TGT A 3') e um DNA molde para controle interno de reação. Os *primers* SA-1 e SA-2 são responsáveis pela amplificação de uma região de 214bp do gene *mecA*, enquanto SA-3 e SA-4, por uma região conservada de 117bp do gene da coagulase. Desse modo, pode se obter a diferenciação simultânea entre

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

3.3.1.1 Extração do DNA genômico.

Para a extração do DNA genômico foi utilizada a técnica de fervura, adaptada de KEARNES, *et al* (1999). Foi adicionado a cada amostra, um mix de extração contendo EDTA 0,1M, Tris HCl 1M (pH 7,5), lisostafina 20000 U/mL (Invitrogen®, Carlsbad, California) e água livre de nucleases. As amostras foram cultivadas em ágar sangue por 24h a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e após o período de incubação, uma alçada foi transferida para 100 μl do mix de extração, em eppendorf de 1,5ml. A extração foi realizada em dois intervalos de temperatura: 30 min a 37°C e 10 min a 100°C . Aguardou-se o resfriamento e foram adicionados 900 μl de água livre de nucleases a cada amostra.

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

3.3.1.2 Reação de amplificação.

Para a reação de amplificação, foi preparada uma mistura de reação contendo Tris-HCl 10mM (pH8,8), MgCl_2 4mM, KCl 50mM, 0,1% de Triton X-100, 200 μM de cada dNTP, 25pmol de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. Subsequentemente, foram adicionados 1 μl da amostra à 49 μl da mistura de reação. A reação de amplificação foi realizada no termociclador PTC200 (MJ Research), utilizando o seguinte programa: 1min a 94°C , seguido por 15 ciclos de 30s a 94°C , 30s a 68°C e 30s a 72°C . Após, seguiram-se mais 20 ciclos de 30s a 94°C , 30s a 60°C e 30s a 72°C . O programa terminou 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 (KATAYAMA, 2000) e *S. aureus* ATCC29213, respectivamente. Como controles positivo e negativo para a amplificação do fragmento de 117bp do gene da coagulase foram utilizados os DNAs extraídos das cepas de *S. aureus* NCTC10442 e *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente. Em todas as reações foi utilizada como controle negativo água destilada deionizada estéril.

3.3.1.3 Eletroforese

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

3.3.2 Determinação do espectro de resistência a agentes antimicrobianos

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

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

3.3.2.1 Preparo da solução estoque do antimicrobiano

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

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

3.3.2.2 Número de diluições

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

3.3.2.3 Preparo das diluições na microplaca

Um volume de 50 μ L de meio de cultura CMHCA (Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado) foi aplicado em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1. Foi acrescentado 100 μ l da diluição a 256 μ g/ml em todos os poços da coluna 1. Com uma pipeta multicanal, foi realizada diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 μ l do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). A mistura foi bem homogeneizada e em seguida foram pipetados 50 μ l do poço A2 para o A3. Este procedimento foi realizado até o poço A11, tendo este um volume final de 100 μ l, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço, com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A₁₂-H₁₂) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, foram inoculados 50 μ l de meio de cultura MHCA mais 50 μ l da suspensão bacteriana (diluída 1:100) (CLSI, 2009).

3.3.2.4 Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/ml) por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm. Esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ou caldo MHCA ($\sim 1,5 \times 10^6$ UFC/ml) (CLSI, 2009).

3.3.2.5 Inoculação da suspensão bacteriana

Foram adicionados 50 μ l da suspensão bacteriana diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). Após o preparo das diluições, a inoculação foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos. Após semeadura, as placas foram homogeneizadas por movimento rotatório e colocadas em saco plástico estéril. As placas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas em atmosfera ambiente (CLSI, 2009).

3.3.2.6 Leitura das CIMs

A leitura foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos poços da microplaca por dois pesquisadores e por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 625nm. Os resultados foram interpretados de acordo com o documento M100-S19 (CLSI, 2009).

3.4 Análise de dados

3.4.1 Caracterização dos pacientes colonizados

As seguintes variáveis foram analisadas a fim de caracterizar e descrever a população de estudo:

Em recém-nascidos:

- Sexo: definido como masculino, feminino ou indeterminado.
- Apgar de 1° e 5° minutos: expresso em algarismos arábicos, variando de 0 a 10, segundo escala de Apgar, calculado pelo neonatologista.

- Peso ao nascimento: expresso em gramas.
- Característica do líquido amniótico ao nascimento: definido como claro, purulento, hemorrágico ou meconial.
- Idade gestacional ao nascimento: expressa em semanas, definida pelo neonatologista. Foi denominado recém-nascido a termo o RN com idade gestacional entre 37 e 41 semanas, desta forma o RN pré-termo foi aquele com menos de 37 semanas e o RN pós-termo foi aquele com mais de 41 semanas de idade gestacional.
- Presença de outras co-morbidades: definidas pelo médico assistente e, posteriormente, classificado como síndrome genética, nefropatia, pneumopatia, hepatopatia, imunodeficiência, doença metabólica, doença de depósito, endocrinopatia, doença dermatológica, neuropatia, infecção congênita, cardiopatia, uso crônico de corticosteróides.
- Utilização de ventilação mecânica (VM): presença de VM desde o nascimento até o término de seguimento.
- Utilização de cateter venoso central (CVC): presença de CVC desde o nascimento até o término de seguimento.
- Utilização de nutrição parenteral (NPT): presença de NPT desde o nascimento até o término de seguimento.
- Utilização transfusão sanguínea: utilização de produtos derivados do sangue (plasma fresco ou congelado, concentrado de hemácias, plaquetas, albumina) desde o nascimento até o término de seguimento.
- Realização de diálise: realização de diálise desde o nascimento até o término de seguimento.
- Procedimentos cirúrgicos realizados: nomes dos procedimentos realizados.
- Utilização de antimicrobianos (ATM): utilização de ATM desde o nascimento até o término de seguimento.
- Tipo de dieta: aleitamento materno exclusivo ou não (utilização de fórmulas lácteas e/ou suplementos alimentares ou jejum).

Em gestantes:

- Idade da gestante: expressa em anos completos.
- Número de gestações, partos e abortamentos da gestante.
- Escolaridade da gestante: obtida em anos completos.
- Tabagismo materno: Foi considerada tabagista, a gestante que já houvesse fumado no mínimo 100 cigarros em toda a sua vida e no momento da entrevista fumasse diariamente ou consumisse cigarros mais de uma vez por semana. As não tabagistas foram definidas por nunca terem fumado mais de 100 cigarros durante a vida ou por terem parado de fumar há mais de trinta dias, segundo questionário obtido do “Behavioral Risk Factor Surveillance System Questionnaire, Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), Chronic Diseases, section 8, 1999.
 - Tabagismo materno durante a gestação: foi coletada informação sobre consumo de cigarro durante a gestação, para posteriormente classificá-las como não fumou durante gestação, fumou durante o primeiro trimestre, fumou durante toda gestação.
 - Comorbidades maternas: definidas pelo médico assistente como doenças prévias à internação hospitalar ou referidas pela própria paciente. Foram avaliadas as seguintes doenças: *diabetes mellitus*, nefropatias, pneumopatias, hepatopatias e cardiopatias crônicas, doenças reumáticas, neoplasias, anemia falciforme, esplenectomia prévia, uso crônico de corticosteróides, rino-sinusite crônica, infecções do trato urinário durante a gestação.
 - Infecção por HIV, presença de doença definidora de AIDS prévia ou atual (segundo definição do Ministério da Saúde do Brasil).
 - Uso de antimicrobianos pela gestante: utilização de qualquer tipo de antimicrobiano desde o início da gestação até o término do seguimento.
 - Tempo (em horas) de rotura prematura de membranas amnióticas: definida como rotura das membranas amnióticas antes do início de trabalho de parto.
 - Tipo de parto: definido como cesárea, normal ou fórcepe.

- Número de toques vaginais ou número de avaliações da gestante.
- Realização de acompanhamento pré-natal: foi avaliado o número de consultas realizadas e a data da primeira consulta.
- Número de pessoas que habitam a mesma residência, informado pela gestante.

3.4.2 Análise descritiva dos dados

As variáveis observadas foram registradas em banco de dados utilizando o software EpiData[®] ("The EpiData Association" Odense, Denmark). Foi realizada a análise descritiva das características de todos os pacientes, colonizados ou não, apresentando-se a frequência para variáveis categóricas e, para as variáveis contínuas, média, desvio-padrão, mediana e intervalo, através da utilização do software Epi Info[®] versão 3.5.3 (CDC, Atlanta, Georgia).

3.4.3 Análise da positividade dos sítios de coleta

3.4.3.1 Criação de bancos de dados

Foram criados dois bancos de dados utilizando o software Microsoft[®] Office Excel 2007 (Santa Rosa, Califórnia), onde foram registrados os resultados das análises laboratoriais dos pacientes colonizados por *S. aureus*, MRSA e MSSA, obtidos nas análises realizadas.

Estes registros serviram de base para que pudéssemos aplicar a análise estatística dos dados a fim de avaliar a positividade dos sítios de coleta para a colonização por *S. aureus*, MRSA e MSSA, tanto em gestantes quanto em RN.

3.4.3.2 Cálculo utilizado

Para o cálculo da positividade, usamos como numerador o número de pacientes (RN ou gestante) colonizados por *S. aureus*, MRSA ou MSSA em determinado sítio e, como denominador, o número total de pacientes

colonizados pelo microrganismo (*S. aureus*, MSSA ou MRSA), de acordo com o numerador.

Por exemplo, para calcularmos a positividade do sítio nasal para detecção de MSSA em RN:

$$\frac{\text{Nº de RN colonizados por MSSA detectados em coleta nasal}}{\text{Total de RN colonizados por MSSA}}$$

Por não considerarmos a nossa definição de paciente colonizado como um padrão ouro, determinamos ser mais adequado analisar a positividade que a sensibilidade e a especificidade dos sítios de coleta.

3.4.4 Determinação dos fatores associados à colonização nasal por *S. aureus*

Para os pacientes colonizados por *S. aureus*, tanto gestantes quanto RN, foi realizada a análise descritiva das características dos pacientes colonizados nas narinas anteriores, associados ou não à colonização em outros sítios, comparando-os aos pacientes não colonizados em narinas, mas sim em sítios extranasais, com o objetivo de se determinar os fatores associados à colonização nasal por *S. aureus*.

Para o cálculo destas análises foi utilizado o software Epi Info™ Versão 3.5.3 (CDC, Atlanta, Georgia). Foi determinado o risco relativo e o intervalo de confiança de 95% para variáveis dicotômicas e uma variável foi considerada significativamente associada com a colonização nasal se o intervalo de confiança não incluiu 1,0. Para as variáveis contínuas, usamos ANOVA e a significância estatística foi considerada se $p < 0,05$. Utilizamos também a análise Chi quadrado e, se valores esperados foram < 5 , o teste exato de Fischer foi escolhido.

4. Resultados

4.1 Caracterização da população de estudo

Foram inicialmente incluídos no estudo 423 RN e 404 gestantes, totalizando 6149 “swabs” coletados, com 1631 isolados *Staphylococcus aureus*. Excluímos três RN que morreram antes da coleta de terceiro dia, cinco RN que não foram coletados no terceiro dia de coleta e 13 RN dos quais, pelo menos um dos “swabs” não pode ser coletado por diversos problemas. Também excluímos do estudo, 20 RN que foram colonizados simultaneamente por MSSA e MRSA. Portanto incluímos neste estudo 382 RN.

Entre as gestantes, excluímos duas que não consentiram na coleta, duas outras gestantes das quais conseguimos coletar apenas três dos quatro “swabs” por dificuldades de coleta e oito gestantes por apresentarem colonização concomitante por MSSA e MRSA. No total, foram incluídas neste estudo 392 gestantes.

Entre as gestantes incluídas neste estudo, a prevalência de colonização por *S. aureus* foi 53% (206). A prevalência de colonização por MSSA foi 49% (191) e a prevalência de colonização por MRSA foi 4% (15). As características dessa população podem ser observadas na Tabela 1.

A prevalência de colonização por *S. aureus* entre RN foi de 47% (181/382). A prevalência de MSSA foi 39% (147) e de MRSA foi 9% (34). As características da população de RN colonizados podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 1 – Características gerais de 392 gestantes submetidas a parto hospitalar, avaliadas quanto à colonização por *S. aureus* - HCFMUSP - fev/2009 a jan/2010

Características	Média (DP)	Mediana	Intervalo
Idade (dados para 391) (anos)	30,5 (6,8)	30	15 – 48
Gestações	2,6 (1,6)	2	1 – 9
Partos prévios	1,3 (1,3)	1	0 – 7
Abortos prévios	0,4 (0,8)	0	0 – 5
Dias de internação (admissão ao parto)	3,0 (7,0)	0	0 – 51
Anos de educação formal (dados para 383)			Frequência
< 5 anos			23 (6%)
5 a 9 anos			102 (27%)
10 a 12 anos			218 (57%)
> 12 anos			40 (10%)
Condições de base			
Infecção do trato urinário tratada durante gestação			108 (28%)
Fumante			91 (23%)
Cirurgia durante o último ano			46 (12%)
Fumou durante a gestação			40 (10%)
Comorbidades			297 (76%)
Hipertensão crônica			89 (23%)
Rinossinusite crônica			77 (20%)
Hipertensão gestacional			58 (15%)
<i>Diabetes mellitus</i> gestacional			44 (11%)
Doenças cardíacas			34 (9%)
<i>Diabetes mellitus</i> não-gestacional			23 (6%)
Doenças vasculares			22 (6%)
Infecção por HIV			6 (1,5%)
Outras			152 (39%)
Medicação usada			
Antimicrobianos durante gestação			130 (33%)
Corticosteróides durante a gestação			20 (5%)
Tipo de parto (dados para 388)			
Cesárea			285 (74%)
Normal			79 (20%)
Fórcipe			24 (6%)

Tabela 1 – Características gerais de 392 gestantes submetidas a parto hospitalar, avaliadas quanto à colonização por *S. aureus* - HCFMUSP - fev/2009 a jan/2010 - conclusão

Características	Média (DP)	Mediana	Intervalo
Anestesia (dados para 389)			
Raqui			264 (68%)
Duplo-bloqueio			83 (21%)
Peridural			18 (5%)
Geral			12 (3%)
Nenhuma			7 (2%)
Local			5 (1%)
Pré-natal (dados para 391)			
No Hospital das Clínicas			290 (74%)
Em outra instituição de saúde			65 (17%)
No Hospital das Clínicas e em outra instituição de saúde			33 (8%)
Não realizado			3 (1%)
Número de consultas (dados para 384)	9,1 (3,8)	9	0 – 23
Idade gestacional na primeira consulta (dados para 384) (semanas)	14,2 (7,2)	13	0 – 37
DP – desvio padrão.			

Tabela 2 – Características gerais de 382 RN de parto hospitalar avaliados para colonização por *S. aureus* - HCFMUSP - fev/ 2009 a jan/2010

Características	Frequência
Sexo masculino	189 (49%)
Apgar (1º minuto)	
8 a 10	344 (90%)
4 a 7	32 (8%)
0 a 3	6 (2%)
Apgar (5º minuto)	
8 a 10	374 (98%)
4 a 7	7 (2%)
0 a 3	1 (<1%)
Peso ao nascer	
>2501g	358 (94%)
1501 a 2500g	9 (2%)
1001 a 1500g	10 (3%)
< 1000g	5 (1%)
Idade gestacional	
<37 semanas	82 (22%)
37 a 41 semanas	298 (78%)
>42 semanas	2 (<1%)
Características do líquido amniótico	
Claro	355 (93%)
Meconial ou hemorrágico	27 (7%)
Antimicrobianos durante a internação	39 (10%)
Cateter venoso periférico	57 (15%)
Nutrição parenteral	30 (8%)
Cateter venoso central	30 (8%)
Ventilação mecânica	18 (5%)
Ventilação não invasiva	16 (4%)
Díalise	9 (2%)
Cirurgia	7 (2%)
Transfusão sanguínea	6 (2%)
Alta hospitalar no 3º dia	300 (79%)

DP – desvio padrão.

4.2 Positividade dos sítios de coleta para cultura de vigilância de *S. aureus*

O melhor sítio anatômico para coletas de culturas de vigilância de *S. aureus* em RN foi o coto umbilical tanto para MSSA quanto para MRSA. Entre as gestantes, o melhor sítio anatômico foi as narinas anteriores. A positividade dos sítios, assim como a positividade das associações de sítios de cultura de vigilância, pode ser observada nas Figuras 3 a 6 e resumidas na Tabela 3.

Em RN, a melhor associação encontrada para a detecção de *S. aureus* foi narina anterior e coto umbilical, capaz de aumentar a positividade para 86% na detecção de MSSA e 91% de MRSA. Entre as gestantes, a melhor associação encontrada foi narinas anteriores e orofaringe, capaz de aumentar a positividade para 83% na detecção de MSSA e 80% de MRSA.

Figura 3 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MSSA em 191 gestantes submetidas a parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade.

Figura 4 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MRSA em 15 gestantes submetidas a parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade.

Figura 5 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MSSA em 147 recém-nascidos de parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade.

Figura 6 – Positividade dos sítios de cultura de vigilância para MRSA em 34 recém-nascidos de parto hospitalar no Hospital das Clínicas de São Paulo (Fevereiro 2009 – Janeiro 2010). Em destaque, na cor preta, o sítio isolado e a associação de sítios com melhor positividade.

Tabela 3 – Positividade de diferentes sítios de cultura de vigilância para *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e resistente a meticilina (MRSA) em gestantes e recém-nascidos do Hospital das Clínicas de São Paulo -Fev/2009 a Jan/2010

Gestantes colonizadas N: 216			Recém-nascidos colonizados N: 181		
Sítio anatômico	MSSA N:191	MRSA N:15	Sítio anatômico	MSSA N: 147	MRSA N: 34
Narinas	59%	67%	Narinas	59%	50%
Ânus	25%	20%	Umbigo	64%	68%
Períneo	24%	20%	Períneo	54%	68%
Orofaringe	52%	47%	Orofaringe	44%	38%
Narinas e Anus	73%	80%	Narinas e Umbilical	86%	91%
Narinas e Períneo	73%	80%	Narinas e Períneo	83%	85%
Narinas e Orofaringe	83%	80%	Narinas e Orofaringe	71%	65%
Anus e Períneo	39%	40%	Umbigo e Períneo	77%	76%
Anus e Orofaringe	69%	53%	Umbigo e Orofaringe	77%	79%
Períneo e Orofaringe	68%	60%	Períneo e Orofaringe	73%	79%

Os perfis de colonização dos pacientes encontram-se na Tabela 4, onde se observa que o sítio de menor frequência encontrada foi o de colonização de orofaringe, sendo que apenas 17% das gestantes apresentaram colonização exclusivamente oral por MSSA e 7% por MRSA. Entre os RN, o perfil de colonização exclusivamente oral também foi o menos frequente, sendo responsável por 4% e 6% dos RN colonizados por MSSA e MRSA, respectivamente. Indicando que, se não realizássemos a coleta de orofaringe, a perda de RN portadores seria consideravelmente pequena.

Observa-se ainda 1% das gestantes colonizadas nos quatro sítios coletados por MSSA e nenhuma colonizada por MRSA, ao passo que 20% dos RN eram colonizados nos quatro sítios por MSSA e 18% por MRSA.

Tabela 4 – Frequência de perfis de positividade de sítios de cultura de vigilância para *S. aureus* em gestantes e recém-nascidos de parto hospitalar do Hospital das Clínicas de São Paulo – Fev/2009 a Jan/2010

Perfil	Sítios de cultura de vigilância				Frequência	
Gestantes (N: 393)						
	Narina	Ânus	Períneo	Orofaringe	MSSA	MRSA
A	+	-	-	-	43 (23%)	5 (33%)
B	-	+	-	-	13 (7%)	1 (7%)
C	-	-	+	-	13 (7%)	2 (13%)
D	-	-	-	+	33 (17%)	1 (7%)
E	+	+	+	+	2 (1%)	0
Recém-nascidos (N: 383)						
	Narina	Umbigo	Períneo	Orofaringe	MSSA	MRSA
A	+	-	-	-	16 (11%)	5 (15%)
B	-	-	-	+	6 (4%)	2 (6%)
C	-	-	+	-	15 (10%)	1 (3%)
D	-	+	-	-	15 (10%)	2 (6%)
E	+	+	+	+	29 (20%)	6 (18%)

+: positiva; -: negativa; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

4.3 Fatores associados à colonização nasal por *S. aureus*

A comparação entre pacientes colonizados por *S. aureus* nas narinas (associada ou não à colonização em outros sítios) e pacientes com colonização apenas extranasal está apresentada nas Tabelas 5 a 8.

Tabela 5 – Comparação das características gerais das gestantes colonizadas por MSSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) com gestantes colonizadas em outros sítios anatômicos, mas não nas narinas - HCFMUSP – Fev/2009 a Jan/2010

Gestantes (N:191)	Nasal N:112	Extranasal N:79	RR – IC 95%	p
Idade (dados para 190) (anos)				
Média (DP)	29,9 (6,6)	29,8 (7,1)	-	0,93
Mediana (intervalo)	30 (14 – 43)	28 (17 – 46)		
Número de gravidezes				
Média (DP)	2,7 (1,6)	2,6 (1,4)	-	0,71
Mediana (intervalo)	2 (1 – 9)	2 (1 – 6)		
Número de partos prévios				
Média (DP)	1,2 (1,2)	1,3 (1,3)	-	0,76
Mediana (intervalo)	1 (0 – 7)	1 (0 – 5)		
Número de pessoas na residência (dados para 187)				
Média (DP)	3,2 (1,4)	3,2 (1,3)	-	0,86
Mediana (intervalo)	3 (1 – 9)	3 (1 – 7)		
Dias de internação até o parto				
Média (DP)	2,9 (6,8)	3,2 (7,0)	-	0,72
Mediana (intervalo)	0 (0 – 37)	0 (0 – 41)		
Tipo de parto (dados para 188)				
Cesárea	80 (71%)	61 (77%)	0,86 (0,67 – 1,11)	0,27
Acompanhamento pré-natal				
No Hospital das Clínicas	96 (86%)	66 (84%)	1,07 (0,76 – 1,53)	0,68
Condições subjacentes				
ITU tratada durante gestação	32 (29%)	22 (28%)	1,01 (0,78 – 1,32)	0,91
Fumante	24 (21%)	17 (22%)	1,00 (0,75 – 1,33)	0,99
Cirurgia no último ano	14 (13%)	6 (8%)	1,22 (0,89 – 1,67)	0,26
Fumou durante gestação	8 (7%)	7 (9%)	0,90 (0,55 – 1,47)	0,66
Comorbidades	84 (75%)	62 (78%)	0,95 (0,73 – 1,25)	0,72
Hipertensão crônica	26 (23%)	11 (14%)	1,26 (0,98 – 1,62)	0,11
Rinossinusite crônica	16 (14%)	15 (19%)	0,86 (0,60 – 1,24)	0,39
Hipertensão gestacional	12 (11%)	16 (21%)	0,70 (0,45 – 1,09)	0,07
Diabetes mellitus gestacional	16 (14%)	6 (8%)	1,28 (0,96 – 1,71)	0,15
Doença cardíaca	7 (6%)	9 (11%)	0,73 (0,41 – 1,29)	0,21
Diabetes mellitus não gestacional	7 (6%)	8 (10%)	0,78 (0,45 – 1,36)	0,33
Doenças vasculares	7 (6%)	7 (8%)	0,84 (0,49 – 1,44)	0,50
Outras	50 (45%)	35 (31%)	1,01 (0,79 – 1,28)	0,96

Tabela 5 – Comparação das características gerais das gestantes colonizadas por MSSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) com gestantes colonizadas em outros sítios anatômicos, mas não nas narinas - HCFMUSP – Fev/2009 a Jan/2010 - conclusão

Gestantes (N:191)	Nasal N:112	Extranasal N:79	RR – IC 95%	p
Medicação durante a gestação				
Antimicrobianos	37 (33%)	25 (32%)	1,03 (0,80 – 1,32)	0,84
Corticosteróides	8 (7%)	5 (6%)	1,05 (0,67 – 1,65)	0,83

RR: risco relativo; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; DP: desvio padrão

Tabela 6 – Comparação das características gerais das gestantes colonizadas por MRSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) com gestantes colonizadas em outros sítios anatômicos, mas não nas narinas - HCFMUSP – Fev/2009 a Jan/2010

Gestantes (N:15)	Nasal N:10	Extranasal N:5	RR – IC 95%	P
Idade (anos)				
Média (DP)	29,2 (5,9)	28,8 (5,8)	-	0,89
Mediana (intervalo)	27 (21 – 39)	26 (23 – 35)		
Número de gravidezes				
Média (DP)	2,1 (1,0)	2,4 (1,5)	-	0,65
Mediana (intervalo)	2 (1 – 4)	2 (1 – 4)		
Número de partos prévios				
Média (DP)	1,1 (1,0)	1,2 (1,6)	-	0,88
Mediana (intervalo)	1 (0 – 3)	1 (0 – 4)		
Número de pessoas na residência				
Média (DP)	2,2 (0,6)	3,6 (1,8)	-	0,04
Mediana (intervalo)	2 (1 – 3)	3 (2 – 6)		
Dias de internação até o parto				
Média (DP)	2,4 (7,2)	2,8 (6,3)	-	0,92
Mediana (intervalo)	0 (0 – 23)	0 (0 – 14)		
Tipo de parto (dados para 14)				
Cesárea	7 (78%)	4 (80%)	0,95 (0,38 – 2,39)	1,00
Acompanhamento pré-natal				
No Hospital das Clínicas	8 (80%)	4 (80%)	1,00 (0,41 – 2,45)	1,00
Condições subjacentes				
ITU tratada durante gestação	3 (30%)	1 (20%)	1,18 (0,57 – 2,42)	0,59
Fumante	2 (20%)	1 (20%)	0,72 (0,17 – 3,03)	0,57
Cirurgia no último ano	1 (10%)	1 (20%)	1,00 (0,41 – 2,45)	0,74
Fumou durante gestação	1 (10%)	1 (20%)	0,72 (0,17 – 3,03)	0,57
Comorbidades	9 (90%)	5 (100%)	0,62 (0,40 – 0,95)	0,43
Outras	4 (40%)	3 (60%)	0,76 (0,36 – 1,62)	0,61
Hipertensão crônica	3 (30%)	2 (40%)	0,86 (0,38 – 1,95)	0,70
Rinossinusite crônica	3 (30%)	1 (20%)	1,18 (0,57 – 2,42)	0,68
Diabetes mellitus gestacional	1 (10%)	1 (20%)	0,72 (0,17 – 3,02)	0,57
Hipertensão gestacional	1 (10%)	0	1,56 (1,05 – 2,30)	0,67
Diabetes mellitus não gestacional	1 (1%)	0	-	0,67
Doenças vasculares	1 (1%)	0	-	0,67
Doença cardíaca	0	0	-	-

Tabela 6 – Comparação das características gerais das gestantes colonizadas por MRSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) com gestantes colonizadas em outros sítios anatômicos, mas não nas narinas - HCFMUSP – Fev/2009 a Jan/2010 - conclusão

Gestantes (N:15)	Nasal N:10	Extranasal N:5	RR – IC 95%	P
Medicação durante gestação				
Antimicrobianos	3 (30%)	2 (40%)	0,86 (0,38 – 1,95)	0,57
Corticosteroides	0	0	-	-

RR: risco relativo; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; DP: desvio padrão; ITU: infecção de trato urinário

Tabela 7 – Características dos recém-nascidos de parto hospitalar com colonização nasal por MSSA (associada ou não a outros sítios) em comparação com aqueles colonizados por MSSA apenas em sítios extranasais - HCFMUSP - Fev/2009 a Jan/2010

Recém-nascidos (N:147)	Nasal n: 87	Extranasal n: 60	RR – IC95%	p
Sexo masculino	40 (46%)	26 (43%)	1,04 (0,80 – 1,37)	0,75
Peso ao nascer				
< 1000g	1 (1%)	2 (3%)		
1001 a 1500g	5 (6%)	3 (5%)	2,35	0,50
1501 a 2500g	-	1 (2%)		
>2501g	81 (93%)	54 (90%)		
Idade gestacional				
<37 semanas	11 (13%)	9 (15%)		
37 a 41 semanas	76 (87%)	50 (83%)	-	0,44
>42 semanas	0	1 (2%)		
Dia de colonização				
Média (DP)	3,3 (0,8)	4,2 (3,8)	-	0,09
Mediana (intervalo)	3 (3 – 21)	3 (3 – 21)		
Tempo de ruptura das membranas (dados para 146) (horas)				
Média (DP)	5,6 (27,3)	2,4 (4,2)	-	0,37
Mediana (intervalo)	0 (0 – 240)	0 (0 – 18)		
Número de toques vaginais				
Média (DP)	2,4 (3,2)	2,4 (2,5)	-	0,99
Mediana (intervalo)	1 (0 – 20)	1 (0 – 10)		
Tipo de parto				
Cesárea	62 (71%)	41 (68%)	1,06 (0,78 – 1,43)	0,70
Normal/fórcipe	25 (29%)	19 (32%)		
Nutrição				
Leite materno	82 (94%)	53 (88%)	1,46 (0,74 – 2,89)	0,16
Nutrição parenteral	6 (7%)	7 (12%)	0,82 (0,45 – 1,50)	0,48
Uso de procedimentos invasivos				
Cateter venoso periférico	8 (9%)	5 (9%)	1,04 (0,66 – 1,64)	0,86
Cateter venoso central	3 (3%)	7 (12%)	0,49 (0,19 – 1,27)	0,09
Ventilação não invasiva	2 (2%)	4 (7%)	0,55 (0,18 – 1,73)	0,23
Ventilação mecânica	1 (1%)	3 (5%)	0,42 (0,08 – 2,28)	0,30
Antimicrobianos	1 (1%)	7 (12%)	0,20 (0,03 – 1,27)	0,01
Alta no 3º dia	76 (87%)	45 (75%)	1,48 (0,93 – 2,37)	0,05

Tabela 7 – Características dos recém-nascidos de parto hospitalar com colonização nasal por MSSA (associada ou não a outros sítios) em comparação com aqueles colonizados por MSSA apenas em sítios extranasais - HCFMUSP - Fev/2009 a Jan/2010 - conclusão

Recém-nascidos (N:147)	Nasal n: 87	Extranasal n: 60	RR – IC95%	p
Condições maternas durante a gestação				
Antimicrobianos (dados para 146)	23 (26%)	16 (27%)	0,99 (0,73 – 1,34)	0,93
Corticosteroides	5 (6%)	7 (12%)	0,69 (0,35 – 1,36)	0,16
Tabagismo	9 (10%)	5 (9%)	1,10 (0,72 – 1,66)	0,68
Presença de comorbidades	64 (73%)	46 (78%)	0,94 (0,70 – 1,26)	0,67
Diabetes mellitus gestacional	8 (9%)	7 (12%)	0,89 (0,54 – 1,46)	0,63
Diabetes mellitus não gestacional	8 (9%)	1 (2%)	1,55 (1,18 – 2,04)	0,08
Hipertensão crônica	16 (18%)	15 (25%)	0,84 (0,58 – 1,22)	0,33
Hipertensão gestacional	17 (19%)	10 (17%)	1,08 (0,78 – 1,50)	0,66
Colonização materna (dados para 146)				
<i>S. aureus</i>	56 (64%)	35 (58%)	1,24 (0,59 – 2,59)	0,54

RR: risco relativo; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; DP: desvio padrão; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a metilicina.

Tabela 8 – Características dos RN de parto hospitalar colonizados por MRSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) em comparação com aqueles colonizados por MRSA apenas em sítios extranasais - HCFMUSP – Fev/2009 a Jan/2010

Recém-nascidos (N:34)	Nasal n: 17	Extranasal n: 17	RR – IC95%	p
Sexo masculino	11 (65%)	9 (53%)	1,28 (0,62 – 2,64)	0,49
Peso ao nascer				
< 1000g	0	0	-	-
1001 a 1500g	0	0	-	-
1501 a 2500g	1 (6%)	1 (6%)	1,00 (0,24 – 4,17)	1,00
>2501g	16 (94%)	16 (94%)		
Idade gestacional				
<37 semanas	4 (24%)	3 (18%)	1,19 (0,56 – 2,52)	1,00
37 a 41 semanas	13 (76%)	14 (82%)		
>42 semanas	0	0	-	-
Dia de colonização				
Média (DP)	3,5 (1,3)	3,2 (1,0)	-	0,56
Mediana (intervalo)	3 (3 – 7)	3 (3 – 7)		
Tempo de ruptura das membranas (horas)				
Média (DP)	1,1 (3,2)	4,1 (11,5)	-	0,30
Mediana (intervalo)	0 (0 – 12)	0 (0 – 48)		
Número de toques vaginais				
Média (DP)	1,5 (2,3)	1,9 (2,0)	-	0,63
Mediana (intervalo)	1 (0 – 7)	1 (0 – 6)		
Tipo de parto				
Cesárea	15 (88%)	14 (81%)	1,29 (0,42 – 4,00)	1,00
Normal/fórcipe	2 (12%)	3 (19%)		
Nutrição				
Leite materno	16 (94%)	16 (94%)	1,00 (0,24 – 4,17)	1,00
Nutrição parenteral	1 (6%)	0	2,06 (1,45 – 2,93)	1,00
Uso de procedimentos invasivos				
Cateter venoso periférico	2 (12%)	1 (6%)	1,38 (0,57 – 3,32)	1,00
Cateter venoso central	0	1 (6%)	-	1,00
Ventilação mecânica	0	1 (6%)	-	1,00
Ventilação não invasiva	0	0	-	-
Antimicrobianos	1 (6%)	1 (6%)	1,00 (0,24 – 4,17)	1,00
Alta no 3º dia	13 (76%)	14 (76%)	0,84 (0,40 – 1,79)	1,00

Tabela 8 – Características dos RN de parto hospitalar colonizados por MRSA nas narinas (associada ou não a outros sítios) em comparação com aqueles colonizados por MRSA apenas em sítios extranasais - HCFMUSP – Fev/2009 a Jan/2010 - conclusão

Recém-nascidos (N:34)	Nasal n: 17	Extranasal n: 17	RR – IC95%	p
Condições maternas durante a gestação				
Antimicrobianos	6 (35%)	3 (18%)	1,52 (0,80 – 2,87)	0,44
Corticosteroides	1 (6%)	0	2,06 (1,45 – 2,93)	0,50
Tabagismo	2 (12%)	1 (6%)	1,38 (0,57 – 3,32)	1,00
Presença de Comorbidades	15 (88%)	9 (53%)	3,13 (0,87 – 11,2)	0,02
Hipertensão crônica	4 (24%)	3 (18%)	1,19 (0,56 – 2,52)	1,00
Diabetes mellitus gestacional	3 (18%)	3 (18%)	1,00 (0,41 – 2,42)	1,00
Diabetes mellitus não gestacional	1 (6%)	1 (6%)	1,00 (0,24 – 4,17)	1,00
Hipertensão gestacional	1 (6%)	1 (6%)	1,00 (0,24 – 4,17)	1,00
Colonização materna				
<i>S. aureus</i>	9 (53%)	7 (41%)	1,27 (0,65 – 2,48)	0,49

RR: risco relativo; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; DP: desvio padrão; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina.

4.4 Características microbiológicas dos isolados

Determinamos a presença dos genes *coa* e *mecA* em 387 isolados, MSSA e MRSA, um de cada paciente, para confirmação da identificação feita através das provas bioquímicas, pela presença dos genes da coagulase e *Meca* respectivamente.

Apenas dois dos isolados foram discordantes, identificados como MSSA na identificação fenotípica, mas apresentarem o gene *mecA* e serem resistentes a oxacilina e cefoxitina na determinação da CIM por microdiluição em caldo. De acordo com as orientações do CLSI 2010, eles foram reclassificados como MRSA.

Após confirmação, foi determinado o perfil de resistência destes isolados através da CIM de 49 isolados MRSA, um de cada paciente às drogas citadas anteriormente, de acordo com o CLSI 2010. O perfil de resistência é mostrado na Tabela 9, através dos valores de CIM encontrados.

Foram observados 2% dos isolados testados sensíveis a oxacilina e resistentes a cefoxitina, carregando o gene *mecA*, observado na reação de PCR. De acordo com definição do CLSI 2010 estes isolados foram classificados como MRSA.

Tabela 9 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana de 49 isolados MRSA testados por microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), provenientes de culturas de vigilância de gestantes e RN de parto hospitalar - HCFMUSP - Fev/2009 a Jan/2010

Antimicrobiano		Frequência	CIM ₅₀ e CIM ₉₀
Penicilina	Resistente	100%	CIM ₅₀ : 32 µg/mL CIM ₉₀ : >32 µg/mL
Oxacilina	Sensível	2%	CIM ₅₀ : >32 µg/mL
	Resistente	98%	CIM ₉₀ : >32 µg/mL
Cefoxitina	Resistente	100%	CIM ₅₀ : 32 µg/mL CIM ₉₀ : 64 µg/mL
Eritromicina	Sensível	31%	CIM ₅₀ : 32 µg/mL
	Resistente	69%	CIM ₉₀ : 64 µg/mL
Clindamicina	Sensível	100%	CIM ₅₀ : 0.12 µg/mL CIM ₉₀ : 0.25 µg/mL
Trimetoprima-Sulfametoxazol	Sensível	100%	CIM ₅₀ : 0.25 µg/mL CIM ₉₀ : 0.5 µg/mL
Tetraciclina	Sensível	98%	CIM ₅₀ : 0.5 µg/mL
	Intermediário	2%	CIM ₉₀ : 1 µg/mL
Vancomicina	Sensível	100%	CIM ₅₀ : 1 µg/mL CIM ₉₀ : 1 µg/mL
Rifampicina	Sensível	98%	CIM ₅₀ : 0.0015 µg/mL
	Intermediário	2%	CIM ₉₀ : 0.015 µg/mL
Cloranfenicol	Sensível	73%	CIM ₅₀ : 8 µg/mL
	Intermediário	27%	CIM ₉₀ : 16 µg/mL
Ciprofloxacina	Sensível	98%	CIM ₅₀ : 0.5 µg/mL
	Resistente	2%	CIM ₉₀ : 0.5 µg/mL
Gentamicina	Sensível	100%	CIM ₅₀ : 0.5 µg/mL CIM ₉₀ : 1 µg/mL

5. DISCUSSÃO

Apesar das mudanças ocorridas no cenário epidemiológico das infecções relacionadas à assistência em saúde, com a progressiva emergência de patógenos gram negativos, as infecções causadas por *S. aureus* continuam causando grande preocupação no ambiente hospitalar, dada a gravidade dessas infecções e as altas taxas de mortalidade. Os protocolos de prevenção disponíveis incluem diversas medidas que dependem de suporte administrativo (implementação de sistemas, contratação de recursos humanos), intervenções educacionais, uso criterioso e controlado de antimicrobianos, medidas padrão de controle de infecção (precaução de contato, uso de barreiras, controle ambiental) e sistemas de vigilância (culturas clínicas, vigilância ativa) seguidos ou não de descolonização e isolamento dos portadores identificados (SIEGEL, 2006).

As culturas de vigilância são realizadas em muitos países de maneira sistemática e representam parte importante dos programas de controle de infecção no ambiente hospitalar. De maneira geral, realiza-se a pesquisa e descolonização de portadores colonizados por MRSA. De qualquer forma, a prevalência de colonização por *S. aureus* na nossa população foi consideravelmente alta, além disto, apesar de não possuírem resistência ao grupo de antimicrobianos beta-lactâmicos, as cepas MSSA podem carrear genes de resistência a outras classes de medicamentos além de uma série de genes de virulência, portanto as cepas MSSA possuem igual capacidade de colonizar e causar infecções, com gravidade igual às cepas MRSA (LAYER, 2006). Pensando nisto analisamos os portadores de MSSA tanto quanto os portadores de MRSA.

De acordo com muitos autores, a coleta de culturas de vigilância nasal é suficiente para a identificação dos portadores de *S. aureus*, especialmente MRSA e muitos estudos e programas de controle de IRAS são baseados na coleta de culturas apenas nasais (MERTZ, 2007; MERTZ, 2009; ANDREWS, 2009; BYRNES, 2010; MARAQA, 2011).

De encontro a estes trabalhos, nosso estudo demonstra que pelo menos 30% dos pacientes colonizados por *S. aureus* seriam erroneamente identificados como não portadores se os demais sítios anatômicos não tivessem sido coletados, assim como observado em estudos anteriores (BITTERMAN, 2010; LAUDERDALE, 2010). Desta forma, os resultados obtidos apenas de culturas nasais podem ser enganosos.

Uma série de outros estudos, afirmam que as culturas de vigilância de orofaringe são importantes para a identificação dos portadores de *S. aureus*. Nilsson e Marshall indicam a coleta de culturas de orofaringe para pacientes cujas culturas nasais apresentam-se negativas (NILSSON, 2006; MARSHALL, 2007). Já o estudo de Nakamura et al demonstrou haver maior taxa de colonização de faringe do que colonização nasal por *S. aureus* entre as 331 crianças estudadas (NAKAMURA, 2010).

De maneira semelhante ao observado em relação à colonização nasal, nosso estudo demonstra que a coleta apenas de culturas de orofaringe representaria uma porcentagem significativa de portadores que seriam erroneamente identificados como não portadores, já que a positividade deste sítio é de, no máximo, 50% de acordo com o observado para gestantes e recém-nascidos.

Foi observado que menos de 17% das gestantes apresentaram colonização exclusiva de orofaringe sendo que, entre as gestantes colonizadas por MRSA, apenas 7% delas apresentaram este perfil de colonização. O mesmo foi observado para os RN, entre os quais menos de 6% dos portadores tiveram colonização exclusiva de orofaringe, o que indica que teríamos deixado de identificar menos de 10% dos portadores caso não houvéssamos realizado a coleta de amostras deste sítio. Resultado semelhante foi observado por CHOW et al, cujo estudo demonstra que a coleta de orofaringe pode ser desconsiderada (CHOW, 2012).

Ao associarmos dois sítios de coleta com a intenção de aumentar a positividade das culturas de vigilância, podemos observar que, mesmo que haja a combinação de culturas de dois sítios anatômicos a efetividade ainda é baixa, variando entre 80 e 90%. Desta forma, é necessária a coleta de

diversos sítios anatômicos para a identificação de todos os portadores de *S. aureus*.

Entre as gestantes, a melhor associação encontrada foi a de narinas e orofaringe, portanto considerando as dificuldades relacionadas ao coletarmos “swabs” de orofaringe, o mal estar causado ao paciente durante a coleta e a baixa positividade apresentada por este sítio, a coleta de orofaringe é importante apenas quando associada à coleta de culturas nasais.

O mesmo não foi observado entre recém-nascidos, onde a melhor associação de sítios encontrada foi de narinas e umbigo. Como previamente demonstrado, o umbigo de recém-nascidos pode ser reservatório para diversas bactérias, inclusive *S. aureus* (MULLANY, 2003).

Ao realizarmos a coleta de culturas de vigilância para *S. aureus*, consideramos que elas são empregadas com três propósitos. O primeiro é realizar a triagem de todos os pacientes logo na admissão hospitalar a fim de identificar os pacientes colonizados por *S. aureus* e conseguir isolá-los, mantendo medidas de precaução de contato, a fim de prevenir a disseminação do patógeno que os coloniza no ambiente hospitalar. Esta estratégia de vigilância ativa é demonstrada em diversos estudos e adotada, especialmente para MRSA e outros patógenos com perfil de resistência antimicrobiana. Considerando a importância epidemiológica e a virulência apresentadas pelas cepas CA-MRSA, esta estratégia tem sido vista por alguns autores como de grande importância para o controle das IRAS, embora haja resultados conflitantes (LEE, 2011).

De acordo com os resultados encontrados em nosso estudo, é necessária a coleta de culturas de vários sítios anatômicos para identificar todos os pacientes assintomáticos e desta maneira, a técnica pode se tornar cara sem a segurança de que todos os portadores serão realmente identificados.

No nosso estudo, coletamos culturas de quatro diferentes sítios anatômicos, mas ainda não podemos ter certeza de termos identificado todos os portadores assintomáticos. É possível que, coletando culturas de

outros sítios como as mãos, tivéssemos identificado uma proporção ainda maior de portadores. Contudo, apesar de sabermos a importância das mãos com relação à transmissão de *S. aureus*, como demonstrado no estudo de Harrington et al, as mãos geralmente carregam microbiota transitória e nosso objetivo foi avaliar uma colonização mais permanente de *S. aureus* (HARRINGTON, 2007).

O segundo propósito de realizar culturas de vigilância é baseado na vigilância ativa e consiste em não apenas isolar, mas exterminar o patógeno antes que haja a sua disseminação pelo ambiente hospitalar. Em alguns países europeus, as culturas de vigilância têm sido utilizadas sistematicamente para identificar portadores e para orientar a descolonização e prevenir a transmissão de *S. aureus*, principalmente de MRSA nos hospitais (HOLZKNECHT, 2010). Chamada de “search and destroy” e amplamente utilizada em hospitais holandeses, esta estratégia é responsabilizada pela baixa incidência de MRSA (VOS, 2009) e tem sido utilizada inclusive em residências de portadores colonizados e profissionais de saúde, incluindo seus animais de estimação (BÖCHER, 2010).

Recentemente a estratégia “search and destroy” foi utilizada com sucesso no controle de um clone de CA-MRSA na Dinamarca (BARTELS, 2010), apesar de a emergência de CA-MRSA ser um desafio ao controle hospitalar já que a comunidade pode ser uma importante e contínua fonte de MRSA para o hospital (HOLZKNECHT, 2010). Segundo Simor et al (2011), a eficácia da descolonização em pacientes com infecção por CA-MRSA ainda não é bem explicada e o procedimento de descolonização para pacientes que não serão submetidos a procedimentos cirúrgicos não é indicado como rotina. Em contrapartida, a descolonização de funcionários do serviço de saúde deve ser considerada como componente do sistema de controle de infecção (SIMOR, 2011).

Associada à procura e descolonização dos portadores, a estratégia europeia conta também com um controle rígido da utilização de antimicrobianos no ambiente hospitalar. Este controle faz com que a pressão exercida pelos antimicrobianos seja menor e, portanto, a seleção de

microrganismos resistentes é conseqüentemente menor. Como resultados, encontramos prevalências muito baixas de MRSA nos países que adotaram esta estratégia: <1% na Holanda (WERTHEIM, 2004; VAN TIEL, 2011).

A coleta de culturas relacionadas à estratégia “search and destroy” geralmente não depende apenas de culturas nasais, ao contrário do que é observado em alguns estudos, e pode incluir outros sítios de coleta como traqueia, períneo, lesões de pele, urina (em caso de uso de cateter urinário), fluido de dreno (em caso de uso de dreno), e/ou locais de saída (em caso de dreno e/ou cateter) de pacientes. No caso de coletas dos profissionais de saúde, podem ser realizadas culturas de narinas, traqueia e lesões de pele, quando presentes (VOS, 2009). Nossos resultados confirmam claramente a necessidade da realização de múltiplas culturas de vigilância a fim de garantir a sensibilidade da identificação de portadores de *S. aureus*, sendo que foi observado que a positividade dos sítios isolados ou mesmo associados dois a dois não é suficiente para a identificação de todos os portadores.

Finalmente, o terceiro propósito pelo qual se emprega a coleta de culturas de vigilância é a descolonização de pacientes colonizados por *S. aureus* antes de procedimentos invasivos com a finalidade de prevenir infecções estafilocócicas relacionadas ao procedimento, através da adoção de terapias antimicrobianas empíricas. Já foi observado previamente que as culturas nasais positivas para MRSA estão relacionadas ao desenvolvimento de infecção estafilocócica (BYRNES, 2010) e estima-se que o risco de infecção em portadores nasais seja 2 a 12 vezes maior do que em não portadores (SIMOR, 2011).

De forma complementar, a ausência de colonização por MRSA em pacientes das unidades de cuidado intensivo tem sido citada como forma de eliminar os eventos de pneumonia associada à ventilação (PAV) que têm como agente etiológico, cepas de *Staphylococcus aureus* (CHAN, 2012).

Embora haja estudos com resultados conflitantes, que demonstram nenhuma ou pouca redução nos índices de infecção (HARBARTH, 2011), de maneira geral os protocolos de descolonização nasal demonstraram ser

eficientes em reduzir infecções estafilocócicas em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, especialmente aqueles submetidos a procedimentos cardiorácicos. Já no caso de colonização extranasal, não há protocolos definidos e os resultados ainda não foram bem avaliados (BODE, 2010; SIMOR, 2011).

Por causa das dificuldades descritas e da falta desses dados, como citado por Andrews et al (2009), tentamos determinar os fatores associados à colonização nasal por *S. aureus* em gestantes e recém-nascidos, que poderiam sugerir uma maior eficácia na identificação de portadores utilizando apenas a cultura de narinas anteriores. Infelizmente nós não encontramos fatores estatisticamente significantes ou úteis na prática clínica, ao analisarmos gestantes e recém-nascidos, que pudessem orientar a coleta de amostras nasais.

As mulheres colonizadas por MRSA nas narinas vivem em residências com número menor de pessoas quando comparadas às mulheres com colonizadas apenas em sítios extranasais ($p: 0,04$). Este dado é difícil de ser explicado e provavelmente tem utilidade clínica limitada. Desta forma, não encontramos fatores que possam favorecer a coleta de culturas nasais e indicar quais pacientes são mais propícios a ser colonizados nas narinas anteriores e quais deveriam ser amostrados em mais sítios anatômicos.

Dentre os fatores a serem observados na realização deste estudo, a escolha pela utilização de métodos convencionais de microbiologia para identificação das culturas de vigilância merece esclarecimento, inclusive pela rapidez demonstrada pelos métodos de identificação molecular. Apesar de mais acessível atualmente, as técnicas de identificação por PCR não fazem parte da realidade observada em nossa prática clínica, na grande maioria dos laboratórios brasileiros. Além disto, o custo envolvido neste tipo de análise, que é 5 a 6 vezes maior, não se justificaria para o nosso estudo, já que as culturas coletadas não foram utilizadas com finalidade diagnóstica.

Mais importante que o tempo de resposta apresentado pelo método de análise, a sensibilidade dos métodos de PCR e meios cromogênicos são

baixos, especialmente para culturas não nasais. De acordo com Van Hal et al (2007), quando comparados métodos moleculares e meios cromogênicos, a melhor sensibilidade observada foi atribuída ao método molecular IDI-MRSA (90%), mas observou-se também a ocorrência de resultados falso-positivos obtidos através dos métodos moleculares testados. De qualquer forma, a padronização destes métodos, tanto moleculares quanto meios cromogênicos tem sido feita apenas para amostras de culturas nasais e o objetivo do nosso estudo era avaliar diferentes sítios de culturas (VAN HAL, 2007; WOLK, 2009).

Neste estudo consideramos que os recém-nascidos que apresentaram uma cultura positiva apenas no momento do parto não foram colonizados e determinamos que esta cultura positiva pode ser considerada como uma cultura de contaminação. De qualquer forma isto é controverso. Não há protocolos que definam em qual momento de vida um recém-nascido pode ser considerado colonizado e acredita-se que a colonização por bactérias gram-positivas ocorra muito cedo (BRAUNCAJS, 2009). Desta forma, é possível que uma cultura positiva no parto possa representar colonização precoce e transiente.

Finalmente, os resultados envolvem apenas um subconjunto de pacientes: gestantes e recém-nascidos, deste modo podem não ser aplicáveis a outras populações de pacientes. Apesar de a prevalência de *S. aureus* ter sido muito alta, a prevalência de portadores MRSA foi relativamente baixa entre as gestantes (4%) limitando a avaliação dos fatores de risco. Este fato deve-se provavelmente ao fato de que, no Brasil comparado a outros países como EUA, o patógeno MRSA não é tão disseminado na comunidade (MORAN, 2006; MIA, 2012).

Além disto, a nossa população de estudo (gestantes) quando comparada a de outros estudos que levam em consideração a prevalência de *S. aureus* em populações de risco, como pacientes internados e funcionários do sistema de saúde, apresenta prevalência de CA-MRSA notoriamente baixa (GRAY, 2010). Dentre os estudos desenvolvidos nos EUA, Chen et al em seu estudo com 2963 gestantes apresentou prevalência

de 17,1% de *S. aureus*, sendo 2,8% MRSA e apenas 2,6% CA-MRSA. Reusch et al demonstraram uma prevalência de 2,1% de MRSA entre mães no período periparto. Da mesma forma, Beigi et al também obteve prevalência de 2,1% de MRSA entre as gestantes do seu estudo (CHEN, 2006; BEIGI, 2007; REUSCH, 2008).

6. CONCLUSÕES

1º. É necessária a coleta de diversos sítios anatômicos para garantir a eficiência do sistema de identificação de portadores baseados em culturas de vigilância. A coleta de culturas apenas nasais não é suficiente para identificar os portadores de *S. aureus*.

2º. Em gestantes colonizadas por *S. aureus*, tanto MRSA quanto MSSA, o melhor sítio de cultura de vigilância são as narinas anteriores, embora a positividade seja baixa. A melhor positividade foi obtida associando os sítios nasal e orofaringe.

3º. Em recém-nascidos colonizados por *S. aureus*, tanto MRSA quanto MSSA, o melhor sítio de cultura de vigilância é o umbilical e a melhor associação foi obtida combinando os sítios nasal e umbilical.

4º. A coleta de culturas de vigilância de orofaringe apresenta positividade insuficiente para identificar pacientes colonizados por *S. aureus* e a perda relacionada a não coleta deste sítio é extremamente baixa, especialmente entre recém-nascidos.

5º. Não há fatores estatística e clinicamente significantes, associados à colonização nasal por *S. aureus* em gestantes e recém-nascidos. Portanto não há fatores predisponentes que orientem a coleta exclusivamente nasal de culturas de vigilância para este patógeno. Assim, os programas de controle que dependem principalmente das culturas de vigilância para identificar portadores podem ser seriamente comprometidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADALETI R, et al. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection in developing countries**. v.2, n.1, p.46-50. 2008.

ANDREWS JI, et al. Screening for *Staphylococcus aureus* carriage in pregnancy: usefulness of novel sampling and culture strategies. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 201, p. 396 (e1-5). 2009.

BACK NA, et al. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive-care unit: use of intensive microbiologic surveillance and mupirocin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.17, p.227–31. 1996.

BARTELS MD, et al. Rise and subsequent decline of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST30-IVc in Copenhagen, Denmark through an effective search and destroy policy. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, p. 78–83. 2010.

BEIGI R, HANRAHAN J. *Staphylococcus aureus* and MRSA Colonization Rates among Gravidas Admitted to Labor and Delivery: A Pilot Study. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**. v.2007, p.1-4. 2007.

BELKUM AV, et al. Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**. v.9, p.32-47. 2009.

BITTERMAN Y, et al. Characterization of the best anatomical sites in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**. v.29. p. 391-7. 2010.

BÖCHER S, et al. The search and destroy strategy prevents spread and long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results from the follow-up screening of a large ST22 (E-MRSA 15) outbreak in Denmark. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, p. 1427-34. 2010.

BODE LGM, et al. Preventing Surgical-Site Infections in Nasal Carriers of *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**. v.362, n. 1, p. 9-17. 2010.

BRAUNCAJS M, OLESIEJUK M, KRZEMINSKI Z. Microorganisms isolated from healthy newborns in the first and third twenty-four hours. **Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia**. v. 61, p.153-8. 2009.

BYRNES MC, et al. Nasal swabs collected routinely to screen for colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units are a sensitive screening test for the organism in clinical cultures. **Surgical Infection**. v. 11, p. 511-5. 2010.

CARDOSO JL, et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.57, p.467-70. 2007.

CHAN JD, et al. Active surveillance cultures of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a tool to predict methicillin-resistant *S. aureus* ventilator-associated pneumonia. **Critical Care Medicine**. v. 40, p. 1437–42. 2012.

CHEN KT, et al. Prevalence of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pregnant Women. **Obstetrics & Gynecology**. v.108, n.3, p.482-7. 2006.

CHOW A, et al. Universal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Screening: Comparison of Anatomic Screening Sites for Patients with High and Low Prevalence of MRSA Carriage. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.33, n.3, p.315-17. 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. Document M07-A8. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

DAR JA, et al. Molecular epidemiology of clinical and carrier strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital settings of north India. **Annals of Clinical Microbiology and antimicrobials**. p.5-22. 2006.

DEURENBERG RH, STOBBERINGH EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**. v.8, p.747-63. 2008.

DEURENBERG RH, STOBBERINGH EE. The Molecular Evolution of Hospital – and Community – Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Molecular Medicine**. v. 9, p. 100-15. 2009.

DUNMAN PM, et al. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.24, p.7341-53. 2001.

ENRIGHT MC, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99. p. 7687–92. 2002.

FRENCH GL. Methods for screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **Clinical Microbiology and Infection**. v.15, suppl.7, p.10-6. 2009.

GILOT P, LEEUWEN WV. Comparative Analysis of *agr* Locus Diversification and Overall Genetic Variability among Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.3, p.1265–69. 2004.

GONZÁLEZ C, et al. Bacteremic Pneumonia Due to *Staphylococcus aureus*: A Comparison of Disease Caused by Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Organisms. **Clinical Infectious Diseases**. v.29, p.1171-77. 1999.

GRAY J, PATWARDHAN SC, MARTIN W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening in obstetrics: a review. **Journal of Hospital Infection**. v. 75, p.89-92. 2010.

HALLIN M, et al. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.59, p.465–72. 2007.

HARBARTH S, et al. Update on screening and clinical diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 37, p. 110-17. 2011.

HARRINGTON G, et al. Reduction in Hospital wide Incidence of Infection or Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* With Use of Antimicrobial Hand-Hygiene Gel and Statistical Process Control Charts. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.28, n.7, p.837-44. 2007.

HOLZKNECHT BJ, et al. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iceland from 2000 to 2008: a challenge to current guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 4221-27. 2010.

JERNIGAN JA, et al. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Epidemiology**. v.143, p.496–504. 1996.

JEVONS MP. 'Celbenin'-resistant staphylococci. **British Medical Journal**. v.1, p.124-5. 1961.

KARCHMER TB, et al. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**. v. 51, n. 2, p. 126-32. 2002.

KATAYAMA Y, ITO T, HIRAMATSU K. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44. 2000.

KEARNS AM, et al. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. **Journal of Hospital Infection**. v. 43, p. 33-37. 1999.

KHAN AU, et al. Amplification of *mecA* gene in multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* strains from hospital personnel. **Journal of Infection in Developing Countries**. v.1, n.3, p.289-95. 2007.

KLEVENS RM, et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. **Journal of the American Medical Association**. v.298, n.15. 2007.

LAYER F, et al. Heterogeneity of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains at a German University Hospital Implicates the Circulating-Strain Pool as a Potential Source of Emerging Methicillin-Resistant *S. aureus* Clones. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.6, p.2179-85. 2006.

LAUDERDALE T-LY, et al. Carriage rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) depend on anatomic location, the number of sites cultured, culture methods, and the distribution of clonotypes. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**. v. 29. p. 1553-59. 2010.

LEE AS, HUTTNER B, HARBARTH S. Control of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 25, p. 155-79. 2011.

LIM TT, COOMBS GW, GRUBB WB. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.50, p.819–24. 2002.

MARAQA NF, et al. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection among infants at a level III neonatal intensive care unit. **American Journal of Infection Control**. v. 39. p. 35-41. 2011.

MARSHALL C, SPELMAN D. Is throat screening necessary to detect methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in patients upon admission to an intensive care unit? **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 3855-6. 2007.

MERTZ D, et al. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, p. 475-7. 2007.

MERTZ D, et al. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage at risk populations. **Archives of Internal Medicine**. v.169, p. 172-8. 2009.

MIA LK, THORP AW, BROWN L. Changes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections presenting to the pediatric emergency department: comparing 2003 to 2008. **Pediatric Emergency Care**. v. 28, p. 131-5. 2012.

MILHEIRIÇO C, OLIVEIRA DC, DE LENCASTRE H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.60, p.42–8. 2007.

MIR N, et al. Soft Salt-Mannitol Agar-Cloxacillin Test: a Highly Specific Bedside Screening Test for Detection of Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, p.986-9. 1998.

MORAN GJ, et al. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. **The New England Journal of Medicine**. v.355, p.666-74, 2006.

MULLANY LC, DARMSTADT GL, TIELSCH JM. Role of antimicrobial applications to the umbilical cord in neonates to prevent bacterial colonization and infection: a review of the evidence. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 22, n. 11, p. 996-1002. 2003.

MURRAY PR, et al. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed., **American Society for Microbiology**. 1999.

NAKAMURA MM, et al. Higher Prevalence of Pharyngeal than Nasal *Staphylococcus aureus* Carriage in Pediatric Intensive Care Units. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 8, p. 2957-59. 2010.

NILSSON P, RIPA T. *Staphylococcus aureus* throat colonizations is more frequent than colonization in anterior nares. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.9, p. 3334-9. 2006.

O'BRIEN FG, et al. Population dynamics of methicillin-susceptible and – resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.64, n.4, p.684-93. 2009.

OLIVEIRA DC, TOMASZ A, deLENCASTRE H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infectious Diseases**. v.2, p.180-9. 2002.

PRAGMAN AA, SCHLIEVERT PM. Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.42, p.147-54. 2004.

REUSCH M, et al. Prevalence of MRSA colonization in peripartum mothers and their newborn infants. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.40, p.667-71. 2008.

ROSENTHAL A, et al. Optimal Surveillance Culture Sites for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Newborns. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.11, p.4234-6. 2006.

ROSSNEY AS, et al. The Emergence and Importation of Diverse Genotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Harboring the Panton-Valentine Leukocidin Gene (*pvl*) Reveal that *pvl* Is a Poor Marker for Community-Acquired MRSA Strains in Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.8, p. 2554–63. 2007.

SAKOULAS G, et al. *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) Group II: Is There a Relationship to the Development of Intermediate-Level Glycopeptide Resistance? **Journal of Infectious Diseases**. v.187. p.929-38. 2003.

SHORE AC, et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 8, p. 3765–73. 2011.

SIBBALD MJJB, et al. Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.70, n.3, p.755-88. 2006.

SIEGEL JD, et al. Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings. **Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)**. 2006.

SIMOR AE, et al. Staphylococcal decolonization: an effective strategy for prevention of infection? **The Lancet Infectious Disease**. v.11, p. 952–62. 2011.

SINGH K, et al. Microbiologic Surveillance Using Nasal Cultures Alone Is Sufficient for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Neonates. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.6, p.2755-7. 2003.

STAPLETON PD, TAYLOR PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science Progress**. v.85, p.57-72. 2007.

STRUELENS MJ, et al. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art an unmet needs. **Clinical Microbiology and Infection**. v.15, n.2, p.112-9. 2009.

TACCONELLI E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: source control and surveillance organization. **Clinical Microbiology and Infection**. v.15, suppl.7, p.31-8. 2009.

TRINDADE PA, et al. Prevalence of SCC*mec* Type IV in Nosocomial Bloodstream Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.7, p.3435-37. 2005.

VAN HAL, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detection: Comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR Assay and GenoType MRSA Direct PCR Assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSA*Select* e CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.8, p.2486-24. 2007.

VAN TIEL FH, et al. Is pre-emptive strict isolation of patients at high risk of colonization with MRSA still required in low-prevalence countries? [letter] **Journal of Hospital Infection**. v.79, p. 271–77. 2011

VIDAL PM, et al. Differences Between “Classical” Risk Factors for Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Risk Factors for Nosocomial Bloodstream Infections Caused by Multiple Clones of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IV MRSA Strain. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.30, n.2, p.139-45. 2009.

VON EIFF C, et al. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v.49, p.157-62. 2004.

VOS MC, et al. 5 years of experience implementing a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy at the largest university medical center in the Netherlands. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. v. 30, p. 977-84. 2009.

WERTHEIM HF, et al. Mupirocin prophylaxis against nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical patients: a randomized study. **Annals of Internal Medicine**. v. 140, p. 419-25. 2004.

WOLK DM, et al. Comparison of MRSASelect Agar, CHROMagar Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Medium, and Xpert MRSA PCR for Detection of MRSA in Nares: Diagnostic Accuracy for Surveillance Samples with Various Bacterial Densities. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, p.3933-36. 2009.