



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, GENÉTICO E DE
SUSCEPTIBILIDADE EM *Staphylococcus spp.* DE
AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE
SAÚDE DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
PERNAMBUCO**

MARCELLE AQUINO RABELO

RECIFE/PE

2012

MARCELLE AQUINO RABELO

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, GENÉTICO E DE
SUSCEPTIBILIDADE EM *Staphylococcus spp.* DE
AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE
SAÚDE DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadora : Prof^a. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora : Prof^a. Dra. Nilma Cintra Leal

RECIFE/PE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

- R114e Rabelo, Marcelle Aquino.
Estudo epidemiológico, genético e de susceptibilidade em *Staphylococcus ssp.* de amostras de pacientes e profissionais de saúde de Hospital Universitário de Pernambuco / Marcelle Aquino Rabelo. – Recife: O autor, 2012.
107 folhas: il. ; 30 cm.
- Orientador: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.
1. *Staphylococcus*. 2. Técnicas de tipagem bacteriana. 3. Pacientes. 4. Bactérias. 5. Pessoal de Saúde. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientador). II. Título.

616.988

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-100)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

MARCELLE AQUINO RABELO

No dia 05 de março de 2012, às 14h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Prof^a. Dr^a. Vera Magalhães da Silveira – Presidente da Banca (UFPE), a Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE) e a Prof^a. Dr^a. Eulália Pessoa Camelo de Azevedo Ximenes (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda MARCELLE AQUINO RABELO sobre a sua Dissertação intitulada “ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E DE SUSCETIBILIDADE À METICILINA DE *Staphylococcus spp.* DE AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO”, a qual foi orientada pela Prof^a. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE) e co-orientada pela Prof^a. Dra. Nilma Cintra Leal (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^a. Dr^a. Vera Magalhães da Silveira

APROVADA

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

APROVADA

Prof^a. Dr^a. Eulália Pessoa Camelo de Azevedo Ximenes

Aprovada

Prof^a. Dr^a. Vera Magalhães da Silveira

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Prof^a. Dr^a. Eulália Pessoa Camelo de Azevedo Ximenes



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

DEDICO,

Aos meus pais, Marcelo e Lúcia pelo amor,
compreensão, apoio e por se fazerem presentes
em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Marília e Marluce que
incondicionalmente me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ofertar-me saúde todos os dias e por sustentar-me, dando-me forças e sabedoria para que eu não desanime diante dos desafios da vida.

À minha mãe, Lúcia, pelo amor, carinho e apoio, e por se fazer sempre presente em minha vida.

Ao meu pai, Marcelo, pelo amor, dedicação, e por estar sempre junto a mim, ajudando e incentivando na conquista dos meus objetivos.

Às minhas irmãs, Marília e Marluce pelo apoio e amizade essenciais durante essa jornada.

Ao meu cunhado, Douglas, por sua amizade e disponibilidade indispensáveis durante essa jornada.

À Professora Amélia Maciel, pela confiança, orientação, ajuda, amizade e paciência que me dedicou durante todos esses anos como orientadora.

À Dra Nilma Leal, pela oportunidade, confiança e paciência depositados.

À todos os meus amigos, especialmente Camila, Natália, Amanda, Annielle e Jean que estiveram ao meu lado principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos companheiros de mestrado, Emmily, Gabriela, Tatiana, Thiago, Wheverton e Fabiana Caraciolo, pela parceria, amizade e pelos momentos compartilhados.

A Armando, pela amizade e por compartilhar diariamente comigo de todas as descobertas e desafios desse estudo.

Ao centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Microbiologia, que possibilitou infra-estrutura para o desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e ao CNPq pela bolsa de estudos.

À Facepe pelo apoio financeiro.

A Juliano Sálvio Cazuzu, chefe do laboratório do HC-UFPE, pela permissão ao acesso às amostras relevantes para o trabalho.

A Mércia, Mitsue, Henrique, Maria do Carmo e Mírian do laboratório de bacteriologia do HC-UFPE, pelo auxílio na coleta de algumas amostras do trabalho apresentado.

A todos os profissionais de saúde do quinto e oitavo andar do HC-UFPE que gentilmente se dispuseram a participar do estudo, especialmente Verônica, Gabriella e Geovana que também contribuíram para a coleta das amostras.

A Stéfany Loibman e Jailton Lobo pela inestimável colaboração no estudo e principalmente pela amizade.

A Ewerton Ferreira por sua paciência, colaboração e disponibilidade em ajudar nos procedimentos de biologia molecular.

A Wagner Oliveira pela ajuda nos procedimentos de PCR.

A Fabiana e Silvana, do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por sua disponibilidade em ajudar com o preparo das soluções.

À Dona Djanira que pacientemente me recebeu diariamente no laboratório de microbiologia e sempre cuidou carinhosamente de tudo e de todos no departamento.

Aos professores e funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos professores da Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco pelo empenho na condução do curso e por todos os ensinamentos.

A Walter Galdino e Alice Lourenço pela amizade e disponibilidade com todos.

A todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo. Meu muito obrigada!

“Pra entender um trabalho tão moderno
É preciso ler o segundo caderno,
Calcular o produto bruto interno,
Multiplicar pelo valor das contas de água, luz e telefone,
Rodopiando na fúria do ciclone,
Reinvento o céu e o inferno...
Desmaterializando a matéria
Com a arte pulsando na artéria
Boto fogo no gelo da Sibéria
Faço até cair neve em Teresina
Com o clarão do raio da silibrina
Desintegro o poder da bactéria”
(Zeca Baleiro)

RESUMO

RABELO, M.A. Estudo epidemiológico, genético e de susceptibilidade em *Staphylococcus spp.* de amostras de pacientes e profissionais de saúde de Hospital Universitário de Pernambuco. 107 f. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Pernambuco- Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco

Desde o relato do primeiro caso de resistência à meticilina em *Staphylococcus* que esse micro-organismo vem sendo considerado como um dos agentes de maior impacto para as infecções associadas aos cuidados em saúde. A disseminação desses isolados bacterianos resistentes a múltiplas drogas em serviços hospitalares é muitas vezes atribuída a profissionais, sendo sugerida a importância do mesmo em surtos. O presente estudo teve como objetivo descrever a diversidade epidemiológica, genética e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* das amostras provenientes de secreção de nasal de profissionais de saúde e amostras clínicas de pacientes internados nas UTIs, hemodiálise/nefrologia e clínicas cirúrgicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, no período de abril a agosto do ano de 2011. Foram coletadas amostras de 91 pacientes internados nesses setores e 120 profissionais que trabalhavam nos mesmos, a fim de realizar isolamento e identificação de *Staphylococcus spp.* Estas amostras foram submetidas a testes de susceptibilidade antimicrobiana, detecção do gene *mecA* e avaliadas quanto a presença de clones por ribotipagem-PCR. Assim, MRS (*Staphylococcus* resistente à meticilina) foi prevalente entre os técnicos de enfermagem, 48,15% (13/27) dentre as amostras positivas, e 40,74% (11/27) dos isolados oriundos dos profissionais de saúde foram das clínicas cirúrgicas. Nos pacientes, a maior ocorrência de isolados *mecA* positivos esteve entre as amostras de ponta de cateter, representando 33,33% (3/9) dos isolados. Foram encontrados oito isolados resistentes à vancomicina dentre os MRS e com base nos padrões de amplificação, descreveu-se 23 ribotipos, sendo um deles descrito em uma amostra de um paciente e de um enfermeiro. O conhecimento do perfil fenotípico e molecular de amostras de *Staphylococcus* pode contribuir para orientar a conduta terapêutica no tratamento e controle das infecções hospitalares.

Palavras-chave: MRS, pacientes, profissionais de saúde, clones.

ABSTRACT

RABELO, M.A. Epidemiological, genetic and susceptibility study of *Staphylococcus spp.* samples from patients and health professionals of the Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco. 107 f. Dissertation, Federal University of Pernambuco Center of Medical Sciences Saude. Postgraduate Program in Tropical Medicine. Recife. Pernambuco.

Since the first case report of methicillin resistance in *Staphylococcus* that this pathogen is considered as one of the agents of greatest impacts to health care-associated infections. The spread of the multidrug-resistant isolates in hospital services is often attributed to health professionals who harbor this microorganism suggesting its importance in outbreaks. The present study aimed to described the epidemiological, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* samples from health care workers' anterior nares and clinical specimens of patients admitted to ICUs, nephrology/hemodialysis and surgical clinics from Hospital das Clinicas, Federal University of Pernambuco in the period April to August at 2011. Samples from 91 patients admitted in these places and 120 health care workers from them will be collected to achieve isolation and identification of *Staphylococcus spp.* These samples are also subjected to antimicrobial susceptibility testing, PCR for *mecA* gene and evaluated for the presence of clones by PCR-ribotyping. Thus, MRS (methicillin-resistant *Staphylococcus*) was more prevalent among nursing technicians, 48.15% (13/27) among the positive samples, and 40.74% (11/27) of the isolates from health professionals were from the surgical clinics. In patients, catheter insertion was the most prevalent sample among *mecA* positive isolates, representing 33.33% (3/9) of the isolates. It was observed eight strains resistant to vancomycin among MRS strains and based on the amplification patterns we describe 23 ribotypes, and one was found in a sample from a patient and nursing staff. Knowledge of the molecular and phenotypic profiles of strains of *Staphylococcus* may help in guiding the therapeutic approach for the treatment and control of hospital infections.

Keywords: MRS, patients, health-care workers, clones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em Ágar Sangue (à esquerda) e microscopia óptica (à direita) de <i>S. aureus</i> mostrando o agrupamento em cachos e os cocos gram positivos, respectivamente.....	22
Figura 2: Cronologia da resistência a antibióticos dos <i>S. aureus</i>	24
Figura 3: Complexo do gene <i>mec</i> . <i>mecR1</i> (indutor) e <i>mecI</i> (repressor).....	28
Figura 4: Combinações entre complexo <i>ccr</i> e complexo <i>mec</i> dos principais tipos de <i>SCCmec</i>	29
Figura 5: Tipos de <i>SCCmec</i> atualmente identificados em cepas de <i>S. aureus</i>	32
Figura 6: Ilustração de alguns dos tipos de <i>SCCmec</i> e sua estrutura.....	33
Figura 7: Esquema representativo da região polimórfica espaçadora intergênica 16S-23S de um operon ribossomal, mostrando localização do pareamento dos <i>primers</i> 1 e 2.....	37

ARTIGO

Figura 1: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana das amostras MRS.....	64
Figura 2: Gel de agarose 1% representativo das amplificações por PCR do gene <i>mecA</i> . Amostras positivas.....	70
Figura 3: Géis de agarose 2% representativos da Ribotipagem-PCR das amostras positivas para o gene <i>mecA</i>	71

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1: Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus spp.</i> por tipo de amostra.....	64
Tabela 2: Distribuição das variáveis relacionadas a aquisição de MRS nos profissionais de saúde do Hospital das Clínicas da UFPE, 2011.....	65
Tabela 3: Distribuição dos isolados <i>mecA</i> positivos por fonte de isolamento.....	67
Tabela 4: Distribuição dos isolados <i>mecA</i> positivos por setor de isolamento.....	67
Tabela 5: Resultados do <i>screening</i> de oxacilina distribuídos por fonte de isolamento.....	67
Tabela 6: Amostras resistentes no <i>screening</i> de vancomicina distribuídos por fonte de isolamento.....	68
Tabela 7: Distribuição dos ribotipos por fonte de isolamento.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-APA: Ácido 6-aminopenicilânico
Ágar Casoy: Ágar Triptona de Soja
ATCC: *American Type Culture Collection*
BEC: *Brazilian Epidemic Clone*
BHI: *Brain Heart Infusion*
bp: Pares de base
CA-MRSA: *Community-Associated MRSA*
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CCIH: Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
ccrs: *cassette chromosome* recombinases
CCS: Centro de Ciências da Saúde
CIM: Concentração Inibitória Mínima
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
DNase: Desoxirribonuclease
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPIs: Equipamentos de Proteção Individual
HC: Hospital das Clínicas
HCA-MRSA: *Health-Care-Associated MRSA*
HCl: Ácido Clorídrico
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
kb: kilobase
IS: Segmento de Inserção
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MLST: *Multilocus Sequence Typing*
MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
MRSE: *Staphylococcus epidermidis* Resistente à Meticilina
MSSA: *Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina
MRS: *Staphylococcus* Resistente à Meticilina
NaCl: Cloreto de sódio
NCTC: *National Collection of Type Cultures*
OFR: *Open Frame Reading*

PBP: *Penicillin Binding Protein*

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

PVL: Leucocidina de Panton-Valentine

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAse: Ribonuclease

rRNA: RNA ribossomal

SCCmec: *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*

SCoN: *Staphylococcus* coagulase negativo

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

STE: SDS+Tris-HCl+EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TBE: Tampão Tris-borato

TE: Tris-HCl+EDTA

Tn: Transposon

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

ULAB: Unidade Laboratorial

USA: *United States of America*

UTIs: Unidades de Terapia Intensiva

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1. APRESENTAÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>	21
2.2 A importância de <i>Staphylococcus spp.</i> como causador de infecções.....	22
2.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos betalactâmicos.....	25
2.4 Múltipla resistência de <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	27
2.5 Métodos de detecção de MRS.....	34
2.6 Tipagem molecular de <i>Staphylococcus</i>	35
2.7 Aspectos epidemiológicos da colonização de pacientes e profissionais por MRS na disseminação de infecções.....	37
2.8 Infecção hospitalar no Brasil.....	39
2.9 MRSA nos hospitais universitários brasileiros.....	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Desenho do estudo.....	44
4.2 Local do estudo.....	44
4.3 População do estudo.....	45
4.4 Categorização das variáveis.....	45
4.4.1 Variável dependente.....	45
4.4.2 Variáveis independentes para profissionais de saúde.....	45
4.4.3 Variáveis independentes para pacientes.....	46
4.5 Operacionalização da pesquisa.....	47

4.5.1 Coleta do material biológico.....	47
4.5.2 Isolamento e identificação do <i>Staphylococcus</i>	47
4.5.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	48
4.5.4 <i>Screening</i> de oxacilina.....	48
4.5.5 Extração de DNA.....	49
4.5.6 Identificação de <i>mecA</i> por PCR.....	49
4.5.7 Ribotipagem – PCR.....	50
4.5.8 <i>Screening</i> de Vancomicina.....	50
4.6 Considerações éticas.....	51
4.7 Análise estatística.....	51
5 . ARTIGO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	72
7.PERSPECTIVAS.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICES.....	100
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PROFISSIONAL DE SAÚDE.....	100
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA PROFISSIONAL DE SAÚDE.....	102
APÊNDICE C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PACIENTE.....	103
APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA PACIENTE.....	105
ANEXOS.....	106
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	106
ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA ULAB-HC.....	107

1. APRESENTAÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os agentes de maior impacto para as infecções associadas aos cuidados em saúde, principalmente após os primeiros relatos de casos de resistência à meticilina, por volta da década de 60 (TAVARES, 2000; LIVERMORE et al., 2003; SANTOS et al., 2007). Profissionais de saúde são portadores, em potencial, dessa bactéria, em decorrência de diversos fatores, dentre eles, a vulnerabilidade conferida no cotidiano do trabalho, podendo assim, atuar como disseminadores desse micro-organismo (BEN-DAVID et al., 2008; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2012).

Alguns trabalhos utilizando amostras provenientes de profissionais das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), clínicas cirúrgicas e serviço de hemodiálise/nefrologia, do Hospital das Clínicas de Pernambuco demonstraram a ocorrência de MRSA por métodos fenotípicos, bem como a caracterização dos fatores de risco relacionados à colonização por este micro-organismo, sugerindo variáveis como faixa etária, categoria profissional, frequência e quantidade de equipamentos de proteção individual (EPIs) utilizados na rotina como associadas à colonização (SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2010b).

Outros estudos descrevem os fatores de risco do hospedeiro associados à colonização por essa bactéria e a idade é considerada um determinante importante, pois as cepas sensíveis à meticilina estariam presentes em maior frequência colonizando a cavidade nasal de crianças (WERTHEIM et al., 2005; LAMARO-CARDOSO et al., 2007; DATTA et al., 2008), enquanto que as cepas resistentes seriam mais prevalentes em pessoas com mais de 65 anos de idade (GRAHAM et al., 2006; SANTOS et al., 2010) e em pacientes com permanência prolongada em enfermarias (LUCET et al., 2003, RIDENOUR et al., 2006; SANTOS et al., 2010) ou expostos a algum tipo de antimicrobiano (CHENG et al., 2008).

A presença dos mesmos clones entre pacientes e profissionais, foi analisada em um estudo epidemiológico através de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) sugerindo a importância dos profissionais de saúde na disseminação de infecções hospitalares (BEN-DAVID et al., 2008). A nasofaringe é considerada o local de colonização mais frequente por MRSA (WERTHEIM et al., 2005; SILVA et al., 2010b) e a sua identificação é considerada como uma estratégia preventiva que permite a redução da incidência de infecções por este micro-organismo (SANTOS, 2009; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2010a). Dessa forma, a identificação de portadores de MRSA é um passo para o estabelecimento de uma política de controle e ajuda a identificar as medidas necessárias para reduzir a pressão da colonização (SANTOS et al., 2010).

A resistência à metilicina é, principalmente, devido à existência de uma proteína que faz parte da síntese da parede celular com baixa afinidade por esse antibiótico, a PBP2a que é codificada pelo gene *mecA*. A detecção deste gene por métodos moleculares é considerada o método “*gold standard*” para identificação de amostras MRS (CHAMBERS, 1997; ARAJ et al., 1999; RIBAS et al., 2003; MIMICA; MENDES, 2007; SWENSON et al., 2007; SECCHI et al., 2008; SHARIATI et al., 2010).

Por outro lado, o método de tipagem, denominado ribotipagem-PCR, tem-se mostrado de alto valor taxonômico e epidemiológico. Essa técnica constitui valiosa ferramenta para identificar e diferenciar isolados do gênero estafilococos de origem humana e animal, sendo útil para epidemiologia molecular podendo ser utilizado para discriminar clones e linhagens clonais (KOSTMAN et al., 1995; FORSMAN et al., 1997; OLIVEIRA; RAMOS, 2002). O uso desse tipo de técnica tem sido útil na questão da disseminação das infecções hospitalares (ALBRICH; HARBARTH, 2008; GORDON; LOWY, 2008).

Apesar da relevância desses micro-organismos como um importante patógeno associado a infecções nosocomiais, estudos que fornecem dados sobre a colonização dos trabalhadores de saúde, principalmente avaliações multi-profissionais em Pernambuco, aliados à sua correlação com os clones causadores de tais infecções ainda são escassos. Diante disto, o presente trabalho objetivou descrever a diversidade epidemiológica, genética e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* das amostras provenientes de secreção de nasal de profissionais de saúde e amostras clínicas de pacientes internados nas UTIs, hemodiálise/nefrologia e clínicas cirúrgicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco analisando os dados epidemiológicos e moleculares das linhagens bacterianas MRS, afim de fornecer subsídios para promoção de ações de controle no hospital.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Está dividido em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase positivo, cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus* e o grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN). Dentre os SCoN mais frequentemente associados a infecções humanas encontramos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus saprophyticus* (KONEMAN et al., 2001).

Geralmente, essas bactérias fazem parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos, porém *S. aureus* está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos, principalmente em ambiente nosocomial, sendo considerada a espécie de maior interesse médico (KONEMAN et al., 2001; CASSETARI et al., 2005; GORDON; LOWY, 2008; SOARES et al., 2008; KLUYTMANS; STRUELENS, 2009).

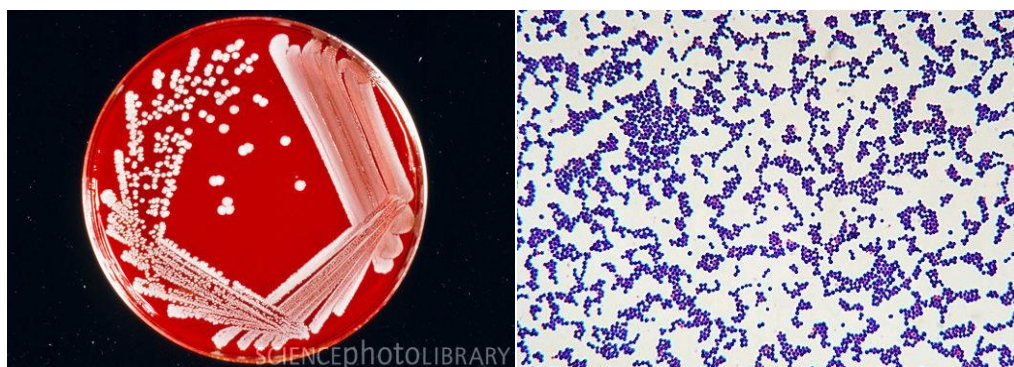
Staphylo vem do grego *staphylé* – cacho de uvas e no exame microscópico, os estafilococos podem apresentar-se como células esféricas, de aproximadamente 0,5 a 1,5µm de diâmetro, agrupadas em diversas formas, desde isoladas, aos pares, tétrades, em cadeias curtas, ou com aspecto semelhante a um cacho de uvas, devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares. São bactérias imóveis e não formadores de esporos, geralmente não capsulados, anaeróbias facultativas, com metabolismo fermentativo (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; SILVA et al., 2007), sendo consideradas gram positivas devido ao fato de sua parede celular, composta em 90% por peptidoglicano, reter o cristal violeta durante a coloração de Gram. No diagnóstico laboratorial, apresentam atividade da catalase positiva distinguindo-se desta forma do gênero *Streptococcus*, que são catalase negativo (KONEMAN et al., 2001; TORTORA et al., 2005; SILVA et al., 2007).

As cepas de *Staphylococcus spp.* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH=7, com temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, e normalmente é possível observar um halo de hemólise em torno das colônias quando o cultivo é feito em placas de ágar sangue (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; CASSETARI et al., 2005; SILVA et al., 2007). Apesar do crescimento em anaerobiose, *S. aureus* e *S. epidermidis* crescem melhor aerobicamente, inclusive a presença de oxigênio é necessária para a produção de pigmento nas colônias (KONEMAN et al., 2001).

Um meio importante para a identificação do *S. aureus* é o ágar manitol salgado, seletivo para essa espécie, uma vez que o *S. aureus* consegue fermentar o manitol, produzindo ácido láctico. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie (KONEMAN et al., 2001; CASSETARI et al., 2005). De acordo com a capacidade de coagular o plasma, os estafilococos são divididos em coagulase positivos e coagulase negativos (KONEMAN et al., 2001).

Desta forma, os *S. aureus* podem ser diagnosticados clinicamente através das provas da catalase, coagulase, fermentação do manitol, além da prova da Desoxirribonuclease (DNase), que consiste na adição de ácido clorídrico sobre as colônias crescidas em meio contendo DNA, para posterior visualização de halo em torno das mesmas. *S. epidermidis* normalmente é diferenciado laboratorialmente das demais espécies de coagulase negativos presentes em amostras clínicas humanas, através da prova da novobiocina, na qual apresenta sensibilidade a droga (KONEMAN et al., 2001).

Figura 1: Colônias de *Staphylococcus aureus* em Ágar Sangue (à esquerda) e microscopia óptica (à direita) de *S. aureus* mostrando o agrupamento em cachos e os cocos gram positivos, respectivamente.



Disponível em <http://www.sciencephoto.com>, acesso 15/03/2012.

2.2 A importância de *Staphylococcus spp.* como causador de infecções

Staphylococcus aureus é referido como uma bactéria comum da microbiota humana, colonizando as narinas de forma intermitente em 30% da população e de forma persistente cerca de 20%. A maioria dos portadores são assintomáticos e o processo de infecção normalmente está associado a algum fator que diminui a resposta imunológica do indivíduo, como doenças ou procedimentos médicos invasivos (GORDON; LOWY, 2008).

Os estafilococos são considerados um problema crescente nas unidades hospitalares e, nos últimos anos, tem sido referido como um dos principais agentes de bacteriemia, frequentemente adquirida no ambiente hospitalar (KLUYTMANS; STRUELENS, 2009).

Essas infecções graves podem gerar consequências preocupantes, principalmente no que diz respeito à antibioticoterapia e prognóstico do paciente (KLUYTMANS et al., 1997; FELTEN et al., 2002; SILVA et al., 2007). Há muitos anos, é de conhecimento notório que mais de 95% dos *S. aureus* em pacientes com infecções, em todo o mundo, são resistentes a tratamentos com antibióticos como penicilina e ampicilina (RUBIN et al., 1999; SILVA et al., 2007).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devidas às toxinas que ele produz. A bacteremia por *S. aureus* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DAS et al., 2007).

Este patógeno pode ser encontrado colonizando a pele úmida em diferentes regiões como nariz, períneo e axilas, o que aliado a fatores de virulência determina sua patogenicidade em infecções frequentemente agudas e piogênicas (CORBELLA et al., 1997; GORDON; LOWY, 2008). De acordo com a localização e outras características, essas infecções podem receber diferentes designações, como foliculite (infecção do folículo piloso), carbúnculo, furúnculos localizados na região cervical posterior, hordéolo (terçol) e impetigo (CORBELLA et al., 1997; SANTOS et al., 2007).

A capacidade de causar infecções invasivas como bacteremias, pneumonia, osteomielite e endocardite é considerada uma característica relevante para esses micro-organismos (FLOCK et al., 1996; COELLO et al., 1997) e se tratando de infecções relacionadas ao uso de dispositivos invasivos como cateteres, *Staphylococcus coagulase negativo* recebe papel de destaque (MACK et al., 2002).

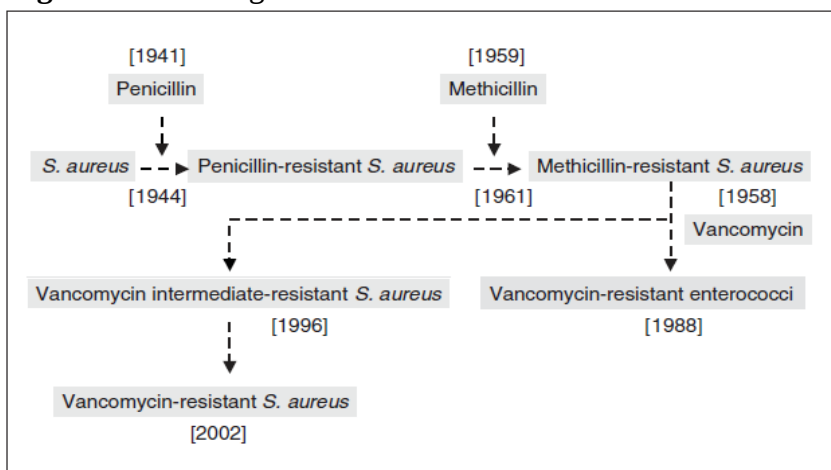
As infecções estafilocócicas eram inicialmente controladas com o uso da penicilina, porém alguns anos após a descoberta desse antibiótico, já em 1942, foram relatados casos de cepas resistentes à penicilina, devido à produção de enzimas denominadas betalactamases. Em 1959, isolou-se ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), tornando possível a produção de penicilinas semi-sintéticas (Figura 2). Modificações na cadeia desse precursor da penicilina resultaram na proteção do anel betalactâmico contra a ação dessas enzimas, estando a oxacilina e a metecilina dentre os primeiros agentes antimicrobianos com essas características. Esses fármacos apresentavam melhor desempenho que a penicilina sobre o *S. aureus* (MARANAN et al., 1997).

Em 1961, no Reino Unido, ocorreram os primeiros relatos de cepas isoladas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que rapidamente emergiram em outros países europeus, onde ocorreram surtos de infecções hospitalares provocados por este micro-organismo, ocorrendo também, relatos de MRSA isolados no Japão, Austrália e Estados Unidos. Diante disto, os MRSA passaram a ser considerados como um importante problema clínico, por se tratarem de um dos principais causadores de infecções, de tratamento cada vez mais difícil, especialmente em pacientes graves, devido às limitadas opções terapêuticas (RUBIN et al., 1999; SHOPSIN; KREISWIRTH, 2001; ENRIGHT et al., 2002; TVERDEK et al., 2008). No ano de 2000, o aumento da resistência à oxacilina entre *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos em todas as regiões foi considerada a principal mudança na resistência antimicrobiana (DIEKEMA et al., 2000; KIM, 2009).

No Brasil, a frequência de isolamento de *S. aureus* e sua relação com infecções hospitalares atingem valores elevados. Em muitos hospitais brasileiros, a prevalência de isolamento de cepas de MRSA varia de 40 a 80% (OLIVEIRA et al., 2001a; TRINDADE et al., 2005; SANTOS et al., 2010) e os dados do Programa de Vigilância a Antimicrobianos mostram que MRSA corresponde a 31% da causa de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo considerado o mais comum dentre os patógenos mais prevalentes (GALES et al., 2009).

Além de ter-se estabelecido mundialmente como o principal patógeno hospitalar, MRSA está se tornando cada vez mais prevalente em infecções de origem comunitária (O'BRIEN et al., 1999; BHATTACHARYA et al., 2007). O primeiro caso de infecção potencialmente fatal por MRSA de origem comunitária no Brasil foi descrito em uma criança do Rio de Janeiro por ROZENBAUM et al (2009) e dados a respeito da prevalência de infecções desse tipo ainda são considerados escassos.

Figura 2: Cronologia da resistência a antibióticos dos *S. aureus*.



Fonte: KIM, 2009.

2.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos betalactâmicos

Os mecanismos de aquisição de resistência podem ser classificados em dois grupos principais: mutação de um gene no cromossomo bacteriano, ou aquisição de um gene de resistência de outro micro-organismo através de transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003).

Nas bactérias gram positivas, os antibióticos betalactâmicos produzem um efeito bactericida através de sua ligação covalente com enzimas, denominadas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), responsáveis por catalisar um estágio da biossíntese do peptidoglicano, um componente da parede celular. Essa ligação resulta em um complexo estável do antibiótico com uma ou mais dessas enzimas, impedindo a formação peptidoglicano, o que por sua vez, leva à morte celular (LYON; SKURRAY, 1987; GIESBRECHT et al., 1998; LOWY, 2003).

S. aureus produz quatro PBPs envolvidas na síntese da parede celular. Além dessas PBPs, uma outra PBP foi descoberta em MRSA, a qual foi chamada PBP2' ou PBP2a porque está localizada entre a PBP1 e a PBP2 quando separadas por eletroforese (ITO; HIRAMATSU, 1998).

Dessa forma, a resistência à meticilina no *S. aureus* é determinada, na grande maioria das vezes, pela presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mecA*, que é responsável pela síntese da PBP2a ou PBP2' (CHAMBERS, 1997; LOWY, 2003; SCHITO, 2006). Este gene é amplamente distribuído entre os *S. aureus* e entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo (ITO et al., 2001) e sabe-se que a PBP2a tem baixa afinidade não só para a meticilina como para os outros antibióticos betalactâmicos (SCHITO, 2006). Esta baixa afinidade confere aos MRSA capacidade de crescimento em presença de antibióticos betalactâmicos, ou seja, a bactéria torna-se resistente a todos os antibióticos dessa classe, inclusive carbapenemas, cefalosporinas e monobactâmicos, restando poucas opções terapêuticas (CHAMBERS, 1997; ITO; HIRAMATSU, 1998; HIRAMATSU et al., 1999; MARTINEAU et al., 2000; DAUM et al., 2002).

O gene *mecA* faz parte de uma ilha genômica de resistência chamada *Staphylococcal Cassete Chromosome mec* (SCC*mec*), que pode conter também outros genes de resistência a antimicrobianos (LOWY, 2003). Este gene também está presente em estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina e não está presente em cepas susceptíveis a este antimicrobiano. Acredita-se que este gene tenha sido adquirido de espécies que não têm relação próxima (ITO; HIRAMATSU, 1998; ENRIGHT et al., 2002). O gene *mecA*, que

codifica PBP2a apresenta altos níveis de homologia entre MRSA e *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) (RYFFEL et al., 1990). Segundo o CLSI, *S. aureus* resistentes à meticilina podem parecer sensíveis *in vitro* a outros betalactâmicos, combinações de betalactâmicos e inibidores de betalactamases, carbapenêmicos e cefalosporinas, mas são ineficazes *in vivo* (CLSI, 2010).

Outros mecanismos de resistência dos estafilococos aos betalactâmicos considerados mais raros e com menor importância clínica já foram descritos. São alguns fatores cromossômicos, cuja atividade afeta o nível da resistência, e muitos destes genes estão envolvidos na biossíntese da parede celular (GIESBRECHT et al., 1998). Em alguns desses casos, o mecanismo de resistência à meticilina está associado com a hiper-produção de β -lactamase, PBPs alteradas (1, 2 e 4) e hiper-produção de PBP4 (MCDOUGAL; THORSNSBERRY, 1986; TOMASZ et al., 1989; HACKBARTH et al., 1995; REISCHL et al., 2000; PETINAKI et al., 2001b; YOSHIDA et al., 2003). Essa hiperprodução de betalactamases é independente do gene *mecA* e promove o chamado fenótipo “borderline” (MARTINEAU et al., 2000). Esses isolados que elevam muito a produção de betalactamases e/ou com PBPs modificadas, em geral, apresentam resistência fenotípica limítrofe ou de baixo grau (MARANAN et al., 1997). Já foi relatada a existência de um homólogo do *mecA*, descrito primeiramente em gado, o CC130, em isolados clínicos na Inglaterra e Dinamarca (CUNY et al., 2011).

Existem genes independentes do locus *mec* que contribuem para a expressão da resistência aos betalactâmicos os quais são designados *fem* (fatores essenciais para a expressão da resistência) que estão presentes no cromossomo de MRSA e MRS (HENZE et al., 1993). Dessa forma, genes como *femA*, *femB* e *mecR1* podem contribuir também para resistência MRSA (BERGER-BÄCHI, 1995). Os genes *femA* e *femB* não tem envolvimento na síntese da PBP2a, mas estão envolvidos na ligação cruzada dos precursores da cadeia peptideoglicano-pentaglicina. A disfunção do *femA* ou *femB* diminui o conteúdo de glicina nos precursores do peptideoglicano e confere susceptibilidade à meticilina. A presença do *femA* é também necessária para o aumento da atividade autolítica nas cepas contendo *mecA* (BERGER-BÄCHI et al., 2002). Interessantemente, *femA* aparece unicamente caracterizando *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de *Staphylococcus* (ÜNAL et al., 1992).

Os SCoN (*Staphylococcus coagulase negativo*) podem ser considerados como reservatórios de genes de resistência a diversos antibióticos no ambiente hospitalar podendo, portanto, transferir esses fatores a outros patógenos hospitalares (SIERADZKI et al., 1999).

Dessa forma, a resistência fenotípica à meticilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heterorresistência fenotípica e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana heterogeneamente resistente carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma (MARANAN et al., 1997).

Alguns pesquisadores têm proposto métodos de laboratório que visam otimizar o tempo de análise e obter resultados mais precisos a respeito do estado de colonização por MRSA (BENICIO; REIS; PIMENTA, 2003; HULETSKY et al., 2005) e segundo alguns autores, a expressão fenotípica da resistência depende de condições de crescimento tais como: temperatura, osmolaridade, suplementos nos meios de cultura, como por exemplo NaCl ou glicose (TENOVER et al., 1999; FERREIRA et al., 2003).

2.4 Múltipla resistência de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo

KATAYAMA et al (2000) demonstraram que o gene *mecA* encontra-se inserido em um elemento genético móvel que serve como veículo de troca de genes de resistência entre as espécies de SCoN e *S. aureus*, este elemento é denominado de *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (*SCCmec*). A distribuição e estrutura dos tipos de *SCCmec* em *S. aureus* é amplamente estudada, porém para os SCoN os dados são apenas comparativos e observados em estudos que visam determinar se houve ou não transmissão entre as espécies.

Com a evolução das técnicas de clonagem e sequenciamento toda região do cromossomo em torno do gene *mecA*, em poucos anos, foi analisada, descrita e classificada, sendo então, encontradas duas regiões essenciais e comuns a todos os estafilococos resistentes à meticilina. Estas regiões foram denominadas como complexo do gene *mec* e complexo do gene *ccr*. As sequências entre os complexos, ou depois deles foram classificadas como regiões “junkyard” (sobras) ou região J (KATAYAMA et al., 2001).

Este *SCCmec* corresponde a um elemento de 21 a 67kb de DNA, caracterizado pela presença de genes que codificam as recombinases *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, complexo *mec* e contendo segmentos de DNA associados, como sequências de inserção (*IS431*) e transposons (*Tn554*), que contêm genes de resistência a outros antimicrobianos (HIRAMATSU, et al., 2001).

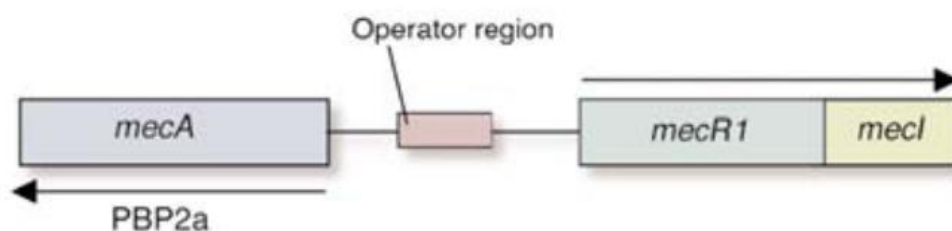
O tipo de *SCCmec* é definido pela combinação do tipo de gene das *ccrs* (*cassette chromosome recombinase*), recombinases (*ccrA* e *ccrB* ou *ccrC*) responsáveis pela

mobilidade do elemento e a classe do complexo do gene *mecA*. A função dessas enzimas é garantir a mobilidade dos *SCCmec* excisando precisamente o elemento do cromossomo e integrando em um sítio específico de um cromossomo receptor. O *SCCmec* é integrado no genoma no sítio *attB_{SCC}* localizado na *ofrX*, uma sequência aberta de leitura (OFR) com função desconhecida (ITO et al., 2001; KATAYAMA et al., 2003; ITO et al., 2004).

Quatro classes principais do complexo gene *mecA* foram identificadas com o uso dos *primers* específicos através da técnica de PCR utilizando o DNA cromossômico, de cepas de várias espécies de estafilococos meticilina resistentes, como alvo. O complexo *mec* contém os genes reguladores da expressão do gene *mecA*, que são o *mecI* e *mecR1* (Figura 3). Estes genes reguladores também estão situados no elemento *SCCmec* do cromossomo bacteriano, logo após o promotor do gene *mecA*. Estes genes podem estar íntegros ou truncados esta característica pode estar associada a alterações estruturais do complexo *mec* que ocorreram pelo movimento ou inclusão de sequências de inserção (*IS*) (KATAYAMA et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram que em algumas cepas de *S. epidermidis* com a sequência intacta do gene *mecI*, apresentava baixos níveis de resistência à meticilina. Experimentos também sugerem que a inativação por deleção (ou mutação *in vivo*) do gene *mecI* pode tornar a cepa capaz de expressar altos níveis de resistência à meticilina, indicando claramente o papel do gene *mecI* na expressão da resistência (SUZUKI et al., 1993; DICKINSON et al., 2000).

Figura 3: Complexo do gene *mec*. *mecR1* (indutor) e *mecI* (repressor).



Fonte: Lowy, 2003.

Esse sistema de genes regulatórios *mecI/mecR*, presentes no genoma do MRSA, codificam as proteínas repressora *mecI* e indutora *mecR1*, respectivamente, sendo esta última denominada proteína transmembrana sinalizadora sensível ao antibiótico betalactâmico. Essas proteínas são transcritas divergentemente, ou seja, a transcrição não acontecerá para o mesmo propósito molecular (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

A proteína *mecI*, quando presente, reprime a transcrição do gene *mecA* e do par de genes *mecR1-mecI* na ausência de antibióticos betalactâmicos, através da ligação à região operadora destes genes no DNA bacteriano. Isso significa que quando não houver antibióticos desta classe no meio ambiente a que a bactéria está exposta, não ocorrerá transcrição do gene *mecA* até a proteína PBP2a nem transcrição dos genes reguladores do *mecA*. Isso acontece por questão de economia energética para a célula bacteriana. Porém, na presença de um antibiótico betalactâmico, o *mecR1*, proteína transmembrana sinalizadora sensível a betalactâmicos, é autocativado cataliticamente e o domínio metaloprotease, que está localizado na parte citoplasmática dessa proteína se torna ativo. Essa metaloprotease cliva a proteína *mecI*, que por sua vez estava ligada à região operadora do *mecA* permitindo assim a transcrição do gene e assim a produção da proteína PBP2a (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

O gene da betalactamase é conhecido como gene *bla* e é geneticamente e bioquimicamente distinto do gene da PBP2a (*mecA*), porém ambos são regulados por sistema indutor e repressor semelhantes. Tanto o gene *bla* quanto o gene *mec* podem controlar a produção da PBP2a e da betalactamase devido à homologia dos dois sistemas regulatórios (KATAYAMA et al., 2003).

Em relação ao complexo do gene *ccr*, sabe-se que ele é composto por quatro tipos de gene de cada enzima recombinase. A enzima *ccrA* do complexo apresenta os alótipos: *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* e *ccrA4*; e a enzima *ccrB*, os alótipos *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4* e *ccrC*.

Os tipos de *SCCmec* são classificados de acordo com a combinação entre o complexo do gene *mecA* e o complexo do gene *ccr*. Os principais tipos de *SCCmec* apresentam as combinações descritas na Figura 4 e sua estrutura encontra-se esquematizada na Figura 6.

Figura 4: Combinações entre complexo *ccr* e complexo *mec* dos principais tipos de *SCCmec*.

SCCmec tipo I	→	complexo do gene <i>mec</i> classe B	→	complexo do gene <i>ccr</i> 1 (<i>ccrAB1</i>)
SCCmec tipo II	→	complexo do gene <i>mec</i> classe A	→	complexo do gene <i>ccr</i> 2 (<i>ccrAB2</i>)
SCCmec tipo III	→	complexo do gene <i>mec</i> classe A	→	complexo do gene <i>ccr</i> 3 (<i>ccrAB3</i>)
SCCmec tipo IV	→	complexo do gene <i>mec</i> classe B	→	complexo do gene <i>ccr</i> 2 (<i>ccrAB2</i>)
SCCmec tipo V	→	complexo do gene <i>mec</i> classe C	→	complexo do gene <i>ccrC</i>
SCCmec tipo VI	→	complexo do gene <i>mec</i> classe B	→	complexo do gene <i>ccr</i> 4 (<i>ccrAB4</i>)

Fonte: KATAYAMA et al., 2000; ITO et al., 2001; MA et al., 2002; ITO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; KONDO et al., 2007.

Finalmente cada *SCCmec* é classificado em subtipos baseado na constituição da sequência das regiões J que não pertence ao complexo do gene *mec* nem ao complexo do gene *ccr* (KATAYAMA et al., 2000; ITO et al., 2001; MA et al., 2002; ITO et al., 2004).

Foi demonstrado que os genes das recombinases codificados no elemento *SCCmec*, *ccrA* e *ccrB* são suficientes para transferir o elemento de um plasmídeo para um cromossomo em um sítio específico e com orientação específica (ROBINSON et al., 2003).

As infecções por MRS são classificadas como de origem hospitalar e, mais recentemente, emergiu o *S. aureus* resistente a meticilina de origem comunitária (Community-Associated MRSA, CA-MRSA) associado principalmente a infecções graves em crianças na comunidade sem fatores de risco e sem hospitalização prévia (KUINT et al., 2007). O CA-MRSA diferencia-se do MRSA hospitalar (Health-Care-Associated MRSA, HCA-MRSA) nas seguintes características: são isolados de pacientes hospitalizados nas primeiras 72 horas e sem histórico de hospitalização prévia recente, sensibilidade a maioria dos agentes antimicrobianos como clindamicina, sulfazotrim e rifampicina, cromossomo *mec* tipo IV ou V e presença dos genes que expressam a Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) (ITO et al., 2001; NAIMI et al., 2003; ITO et al., 2004; FRIDKIN et al., 2005; HISATA et al., 2005; DAUM, 2007).

No momento, onze tipos diferentes de *SCCmec* (Figura 5), que diferem em estrutura e tamanho, foram descritos (ITO et al., 2001; ITO et al., 2003; TAKANO et al., 2007; CONCEIÇÃO et al., 2010; ZONG et al., 2011). Quatro tipos de elementos *SCCmec* (tipos I, II, III e VI) são associados a infecções nosocomiais. Os tipos IV e V são amplamente disseminados entre cepas comunitárias (HISATA et al., 2005), ou seja, enquanto os HCA-MRSA carregam *SCCmec* dos tipos I a III, os CA-MRSA estão mais associados aos tipos IV, V e VII (ITO et al., 2004; TAKANO et al., 2007). Os tipos IV e V são elementos genéticos menores e com mais mobilidade que os outros. Esses tipos carregam menos genes determinantes de resistência que os tipos I, II e III. Por isso, os CA-MRSA caracteristicamente tendem a ser menos multirresistentes que os HCA-MRSA, mantendo em geral sensibilidade à clindamicina, por exemplo (ITO et al., 2001; NAIMI et al., 2003; ITO et al., 2004; FRIDKIN et al., 2005; DAUM, 2007). Os *SCCmec* tipos I, II e III, associados a cepas de origem hospitalar, têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos betalactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina e quinolonas (HIRAMATSU et al., 1999).

O *SCCmec* tipo I com cerca de 34 kb, foi detectado na cepa NCTC10442, correspondente ao primeiro MRSA isolado em 1961, no Reino Unido, o tipo II (52 kb) foi

identificado em uma cepa de MRSA, isolada no Japão em 1982, denominada N315, e o tipo III (66 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada em 1985 na Nova Zelândia, denominada de 82/2082. Posteriormente, foi identificado, em duas cepas associadas a infecções comunitárias, o menor elemento *mec*, o tipo IV (20 a 24 kb), que confere aos MRSA um perfil de sensibilidade diferente dos outros três tipos (DUARTE; DE LENCASTRE, 2002; OKUMA et al., 2002).

O elemento tipo V (28kb) foi descrito a partir do cromossomo de uma cepa de MRSA, de origem comunitária, isolada na Austrália, denominada WIS (WBG8318). Este elemento foi estruturalmente similar ao *SCCmec* tipo IV (ITO et al., 2004). Os *SCCmec* tipo IV e V não possuem nenhum outro determinante de resistência a antimicrobianos além do gene *mecA*, o que explica uma das principais características dos isolados comunitários de MRSA, a sensibilidade a diversos antimicrobianos não betalactâmicos (DUARTE; DE LENCASTRE, 2002; ENRIGHT et al., 2002; OKUMA et al., 2002; ITO et al., 2004). O *SCCmec* tipo VI, é considerado de origem comunitária e apresenta similaridade com o *SCCmec* tipo IV em tamanho, porém é definida pelo tipo de *ccr* apresentada (OLIVEIRA et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2010)

O *SCCmec* tipo VII foi descrito em cepa de *S. aureus* comunitário em Taiwan, apresentando cerca de 41 pb (HIGUCHI et al., 2008), já o tipo VIII foi descrito em cepa epidêmica Canadense, com 32pb (ZHANG et al., 2009). Os tipos IX, X e XI foram descritos em um trabalho realizado no oeste da China, porém esses novos tipos ainda não estão bem caracterizados (ZONG et al., 2011).

Estudo sobre o *SCCmec* tipo IV demonstrou que os SCoN são reservatórios de resistência e que a transmissão ocorreu dos SCoN para os *S. aureus*. Até a década de 70, isolados clínicos de *S. aureus* não apresentavam *SCCmec* tipo IV, sendo encontrado apenas em *S. epidermidis*. Apenas na década de 80, foram relatados isolados de *S. aureus* com este tipo de elemento móvel (WISPLINGHOFF et al., 2003). Existem várias linhas de evidência sobre a origem do *SCCmec*, mas se sabe que a resistência à metilicina é altamente prevalente em isolados de *S. epidermidis*, em cerca de 70%, e menos comum em *S. aureus*, sugerindo que *S. epidermidis* é o reservatório para *SCCmec* (WIELDERS et al., 2001).

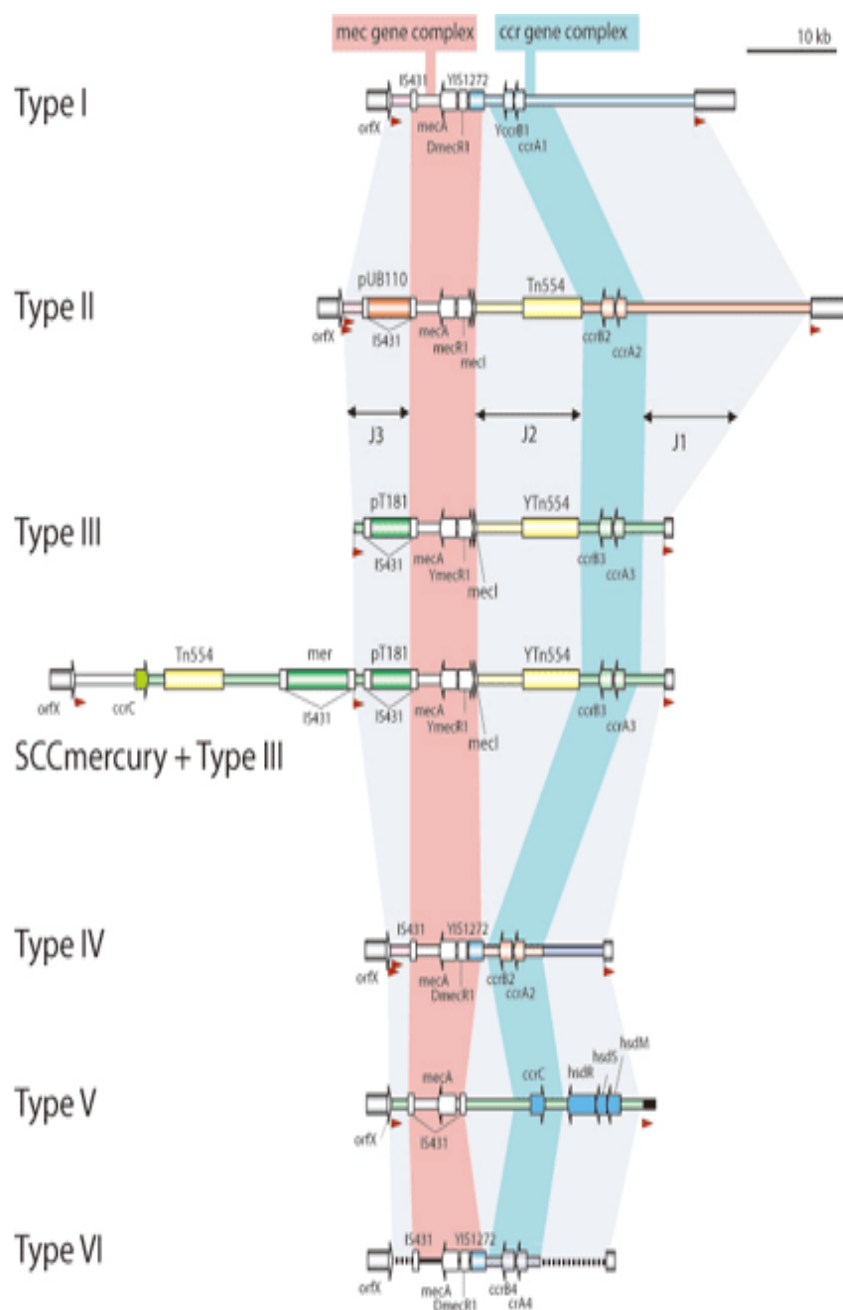
Parece que os *SCCmec* servem como veículo para trocas úteis a uma melhor sobrevivência dos estafilococos em vários ambientes, além de conter genes de resistência a outros antibióticos e outros genes e pseudogenes que codificam enzimas com diversas funções (HIRAMATSU et al., 2004).

Figura 5: Tipos de *SCCmec* atualmente identificados em cepas de *S. aureus*.(O gene *ccr* ou o complexo *ccr* estão indicados entre parêntesis).

SCCmec types	<i>ccr</i> gene complexes	<i>mec</i> gene complexes	strains
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E	LGA251

Disponível em http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html, acesso 09/01/12.

Figura 6: Ilustração de alguns dos tipos de *SCCmec* e sua estrutura.



Disponível em <http://www.staphylococcus.net/> acesso em 15/10/11.

2.5 Métodos de detecção de MRS

As metodologias que se destacam entre as mais utilizadas ou com melhor poder de identificação de MRS são: a microdiluição em ágar, disco-difusão, o método de triagem (*screening*) em ágar com oxacilina, métodos automatizados (Microscan, Vitek), látex aglutinação e o método molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOHNER et al., 1999; DE PAULIS et al., 2003; MIMICA; MENDES, 2007; SHARIATI et al., 2010).

Para detecção rotineira da resistência à metilicina os testes de disco-difusão são os mais largamente utilizados. Dentre todas as penicilinas penicilase-estáveis (cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, metilicina e nafcilina), a oxacilina é a preferida para testes *in vitro* utilizando disco-difusão. Para os *S. aureus*, os testes com disco de cefoxitina seriam, no mínimo, comparáveis em acurácia aos testes com disco de oxacilina, porém em geral o primeiro teria leitura mais fácil, devido ao maior halo (CLSI, 2007; PEREZ; D'AZEVEDO, 2008; SECCHI et al., 2008; DATTA et al., 2011). Neste caso, cabe lembrar que o teste com disco de cefoxitina tem a finalidade de detectar resistência à oxacilina e não a própria cefoxitina.

Também são utilizados os testes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da oxacilina para os estafilococos, incluindo métodos de diluição em Ágar e em caldo (macrodiluição e microdiluição), e de gradiente de difusão em ágar (E-test®: Ab Biodisk, Solna, Suécia) (VELASCO, 2005; MIMICA et al., 2007). No entanto, devido à existência de outros mecanismos de resistência, esses métodos podem e devem ser utilizados como confirmatórios e/ou adjuvantes em isolados nos quais o padrão de susceptibilidade é duvidoso ou de difícil diagnóstico (MIMICA; MENDES, 2007).

Outro teste que pode ser utilizado para a detecção da resistência com acurácia geralmente excelente é o teste de *screening*, com placa contendo Ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6µg de oxacilina por mililitro (KOHNER et al., 1999; VELASCO, 2005; CLSI, 2007; MIMICA et al., 2007, SHARIATI et al., 2010). Uma vantagem do teste é o baixo custo, sobretudo quando se deseja testar vários isolados ao mesmo tempo e apenas para a oxacilina, por exemplo, em estudos de vigilância (MIMICA; MENDES, 2007; SHARIATI et al., 2010).

Existem também os métodos automatizados, porém é difícil comparar os resultados desses estudos visto que há frequentes mudanças de software e diferentes cartões ou painéis disponibilizados (FELTEN et al., 2002; SWENSON et al., 2007).

Para detecção da heterorresistência a cefoxitina é considerada um melhor preditor que a oxacilina porque é um forte indutor da PBP2a. No teste de disco-difusão a cefoxitina pode ser utilizada para prever a presença do gene *mecA* com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparada com a detecção do gene *mecA* pela PCR (FELTEN et al., 2002; SILVA-CARVALHO et al., 2009; SOUSA JUNIOR et al., 2010).

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerada o método “*gold standard*” para avaliação qualitativa da resistência à meticilina (CHAMBERS, 1997; ARAJ et al., 1999; RIBAS et al., 2003; MIMICA; MENDES, 2007; SWENSON et al., 2007; SECCHI et al., 2008; SHARIATI et al., 2010). Um método com acurácia próxima a 100% é a detecção do produto do gene *mecA*, a PBP2a, por meio de métodos de aglutinação em látex (CAVASSINI et al., 1999; FELTEN et al., 2002; SILVA-CARVALHO et al., 2009; SOUSA JUNIOR et al., 2010), porém esses métodos ainda são pouco difundidos e/ou utilizados, principalmente devido ao seu custo (VELASCO, 2005; SILVA-CARVALHO et al., 2009).

Para a detecção dos tipos de *SCCmec*, as técnicas mais utilizadas são a PCR-multiplex e a tipagem por sequência multi-lócus (MLST, Multilocus Sequence Typing) (OLIVEIRA; DE LENCASTRE, 2002). Os métodos genético-moleculares também são capazes de detectar o potencial das cepas produzirem toxinas, pois existem casos em que genes de toxinas não são expressos (HOLEKOVA, et al., 2002).

2.6 Tipagem molecular de *Staphylococcus*

Segundo TENOVER et al (1995), a análise de tipagem molecular deve ser aplicada a isolados que estejam relacionados a pelo menos um dos itens: (1) a uma área específica na qual a infecção está ocorrendo, (2) a um período comum a uma dada infecção, (3) ou a uma fonte comum de uma infecção. Ademais, segundo este mesmo autor, estudos de tipagem molecular realizados sobre isolados os quais não apresentam nenhuma correlação epidemiológica podem conduzir a informações errôneas.

A tipagem molecular utilizada na identificação de *S. aureus* é útil, particularmente em situações epidêmicas, pois evidencia a presença de um clone predominante ou a policlonalidade e permite avaliar se ocorreu transmissão pessoa a pessoa ou resulta da política uso de antimicrobianos (SAIMAN et al., 2003; KIM, 2009).

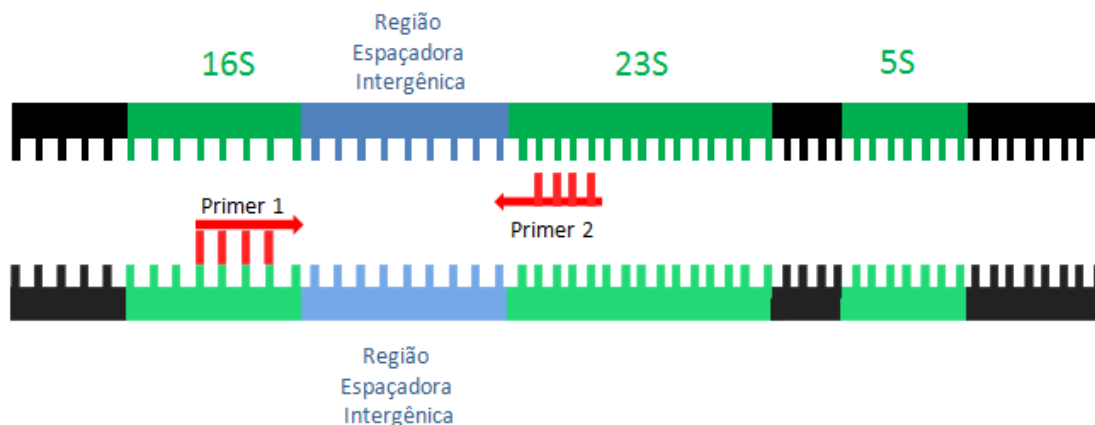
Existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus* (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995), a qual pode ser explorada para

investigar a disseminação de estirpes de *S. aureus* de origens humana e animal. A avaliação desses traços heterogêneos inclui as variações das características bioquímicas e de sensibilidade a antimicrobianos, a fagotipagem, o perfil da presença de plasmídeos, o estudo das regiões variáveis dos genes da coagulase, da região X da proteína A e do espaçador intergênico entre as regiões 16S e 23S do RNA ribossomal, a amplificação aleatória de segmentos genômicos (RAPD-PCR) e a macrorrestrição do DNA celular total detectada pela eletroforese de campo pulsado (PFGE) (LANGE et al., 1999).

Uma técnica amplamente utilizada em estudos epidemiológicos é a da PCR-ribotipagem. Esse método foi desenvolvido com a finalidade de permitir a amplificação de regiões polimórficas do espaçador intergênico da região 16S-23S do RNA ribossomal (Figura 7), o que possibilita a tipificação de isolados de *S. aureus* de importância epidemiológica de forma simples e rápida (KOSTMAN et al., 1995; FORSMAN et al., 1997; OLIVEIRA; RAMOS, 2002). Esses espaçadores intergênicos estão localizados entre os genes do RNA ribossomal e podem diferir em tamanho e em número de cópias, em decorrência da semelhança ou da diversidade existentes entre as estirpes analisadas (CUNY; CLAUS; WITTE, 1996). Outra técnica utilizada para análise da clonalidade de cepas é o PFGE, cuja aplicação em rotina apresenta custo elevado e necessita de mão de obra especializada (CORDEIRO, 2004; GORDON; LOWY, 2008). Esta técnica é considerada padrão-ouro, e além de ser um procedimento tecnicamente exigente e demorado, a sua completa reprodutibilidade nos laboratórios é um desafio tornando os dados de difícil comparação (SABAT et al., 2006).

Essas técnicas foram úteis para trazer novamente a questão sobre o papel do profissional de saúde na disseminação da infecção hospitalar. Apesar de não ser confirmado que esse profissional realmente contribui para a disseminação (ALBRICH; HARBARTH, 2008; GORDON; LOWY, 2008), diversos trabalhos com base em técnicas moleculares descritas sugerem que profissionais, médicos e alunos são importantes veículos de disseminação de clones epidêmicos (HIRAMATSU et al., 2001; EVEILLARD et al., 2004; EVEILLARD et al., 2006; BEN-DAVID et al., 2008).

Figura 7: Esquema representativo da região polimórfica espaçadora intergênica 16S-23S de um operon ribossomal, mostrando localização do pareamento dos *primers* 1 e 2.



Fonte: KOSTMAN et al., 1992 modificado.

2.7 Aspectos epidemiológicos da colonização de pacientes e profissionais por MRS na disseminação de infecções

O sítio anatômico do qual o *S. aureus* pode ser mais frequentemente isolado é a região das narinas anteriores, podendo ser disseminado para outras partes do corpo (KLUYTMANS et al., 1997; SINGH et al., 2003). A detecção precoce de portadores de MRSA é considerada essencial na investigação epidemiológica, para a rápida implementação de isolamento destes pacientes colonizados, para o controle e prevenção da disseminação destes isolados (FRANCOIS et al., 2003; SANTOS et al., 2010).

Usualmente, *S. aureus* atinge as narinas através das mãos contaminadas no meio ambiente, e fatores da bactéria associados à capacidade em aderir às células do hospedeiro e evadir-se de seu sistema imunológico, são a base para manter a colonização (WERTHEIM et al., 2005; GORDON; LOWY, 2008).

No estudo realizado por BORER et al (2002), foi relatado que a alta prevalência de infecção de pele por MRSA pode ser um fator de risco para a aquisição de colonização nasal persistente por este micro-organismo, aumentando a sua transmissão entre as pessoas. A presença desses isolados nas narinas interfere na capacidade de colonização por outra bactéria (SHINEFIELD; RUFF, 2009). Por outro lado, em um trabalho que avaliou a mortalidade de pacientes com bacteriemias causadas pelo MRSA, foi observado que pacientes com

colonização prévia e que se tornavam bacterêmicos apresentavam mortalidade menor do que aqueles que inicialmente não eram colonizados, sugerindo que a colonização poderia conferir imunidade protetora quanto ao desenvolvimento de infecção (WERTHEIM et al., 2004).

Muitos estudos descrevem os fatores de risco do hospedeiro associados à colonização pelo *S. aureus* e a idade é considerada um determinante importante, já que crianças teriam maior frequência de colonização nasal por cepas sensíveis à meticilina (WERTHEIM et al., 2005; LAMARO-CARDOSO et al., 2007; DATTA et al., 2008), enquanto que as cepas resistentes seriam mais prevalentes em pessoas com mais de 65 anos de idade (GRAHAM et al., 2006; SANTOS et al., 2010). O risco de colonização pelo MRSA também aumenta em pacientes hospitalizados com permanência prolongada (LUCET et al., 2003, RIDENOUR et al., 2006; SANTOS et al., 2010) e naqueles expostos a algum tipo de antimicrobiano (CHENG et al., 2008). Outros fatores importantes relacionados a pacientes são: presença de lesões de pele, presença de *diabetes mellitus*, necessidade de diálise ou hemodiálise, uso de drogas intravenosas e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KLUYTMANS et al., 1997, WERTHEIM et al., 2005; GORDON; LOWY, 2008).

A disseminação dessa bactéria a partir dos pacientes dá-se pela transmissão cruzada, com os profissionais de saúde que atuam como vetores entre pacientes colonizados e não colonizados (BEN-DAVID et al., 2008). Os profissionais de saúde, além de atuarem na disseminação do MRSA entre os pacientes, podem transmiti-lo em seu domicílio para familiares, os quais podem desenvolver infecções em pele e mucosas (EVEILLARD et al., 2004; ALBRICH; HARBARTH, 2008).

Uma revisão de literatura sobre a importância dos profissionais de saúde em surtos de MRSA, mostrou que apenas em 1,6% dos surtos descritos podem ter origem atribuída a um profissional de saúde colonizado de forma assintomática (VONBERG et al., 2006), fazendo com que a busca de forma rotineira, por profissionais colonizados por MRSA, não seja aconselhada, da mesma forma, a sua descolonização, principalmente devido ao custo associado (ALBRICH; HARBARTH, 2008). Essa busca deve ocorrer quando há dados epidemiológicos que sugiram esta fonte de transmissão (SIEGEL et al., 2007; BEN-DAVID et al., 2008), ou como último recurso para a contenção de transmissão, quando outras medidas já foram tomadas em um surto (WENZEL et al., 1998).

Um estudo de série de casos relata MRSA como fonte de doença ocupacional, em profissionais de saúde colonizados por esse micro-organismo e que desenvolveram infecção após situação de trauma durante suas atividades ou no domicílio. Também foi relatada a

ocorrência de infecção por MRSA após contato com paciente portador ou seus fluidos corporais (HAAMANN; DULON; NIENHAUS, 2011).

Dessa forma, a identificação de portadores de MRSA é um passo para o estabelecimento de uma política de controle e ajuda a identificar as medidas necessárias para reduzir a pressão da colonização (SANTOS et al., 2010).

2.8 Infecção hospitalar no Brasil

Confirmando a tendência internacional de gerar clones com alta capacidade de disseminação e patogenicidade, foi descrito no Brasil um clone epidêmico regional, posteriormente denominado de BEC, *Brazilian Epidemic Clone*. A caracterização foi realizada em 1995 por TEIXEIRA et al. a partir de 152 cepas isoladas em hospitais no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Amazonas. Poucos anos depois, após a publicação que descrevia este clone, outros hospitais da América do Sul, Europa e China identificaram cepas com o mesmo perfil gênico, caracterizando disseminação global (OLIVEIRA et al., 1998; DE SOUSA et al., 2003; SENNA et al., 2003).

Apesar deste clone, dominar a grande maioria dos hospitais brasileiros, outros clones epidêmicos também são frequentemente isolados em hospitais do Brasil como o clone Ny/Jp descrito no Japão e Estados Unidos (MELO et al., 2004; MIRANDA et al., 2007; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010). A disseminação em escala global sugere a participação de indivíduos da comunidade como portadores e transmissores indiretos dessas cepas. Tal fato gera a preocupação da dispersão de MRSA na população que não possui contato com hospital, o que, sem dúvida, pode estar acontecendo. Em um estudo realizado em Goiânia, amostras de 1.192 crianças foram analisadas, resultando na identificação de 3 tipos de *SCCmec* (tipo III, IV e V) com 82,7% de similaridade genética ao clone brasileiro, sendo o tipo V encontrado em uma criança saudável e sem histórico de contato hospitalar ou fator de risco para essa infecção, o que pode significar disseminação para a comunidade (LAMARO-CARDOSO et al., 2009). Em outro estudo realizado nessa região, foram encontradas cepas com *SCCmec* tipo III e perfil multirresistente, levantando a hipótese de origem hospitalar dessas estirpes, apesar das amostras serem coletadas nas primeiras seis horas de admissão, sugerindo uma disseminação para a comunidade pediátrica desses isolados (LAMARO-CARDOSO et al., 2007).

Com o aumento dessas infecções causadas por MRSA, aumenta também o uso da vancomicina, em muitos casos, a única droga ainda efetiva contra essas cepas. Contudo, o aumento da pressão seletiva levou ao isolamento, em 1997, da primeira cepa de *S. aureus* resistente à vancomicina no Japão (HIRAMATSU et al., 1997) e, em 2001, no Brasil (OLIVEIRA et al., 2001c).

Apesar de relatos de outros países de resistência à vancomicina, nenhum indício de clonalidade entre os isolados foi encontrado (COIA et al., 2006).

2.9 MRSA nos hospitais universitários brasileiros

Os trabalhos publicados nos hospitais universitários brasileiros relatam principalmente a ocorrência de surtos (GUILARDE et al., 2006), colonização de pacientes (SILVA et al., 2003) e colonização da equipe (HESHIKI et al. 2002; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2010b; SILVA et al., 2012).

Em um estudo realizado em um hospital universitário de Londrina, a colonização por *S. aureus* em membros da equipe médica foi próxima a normalmente encontrada na comunidade: 17,68%, sendo 1,19% portadores de MRSA (HESHIKI et al. 2002). Já em um hospital universitário de Recife, a colonização dos profissionais de saúde atingiu 25,7%, porém o percentual de MRSA foi considerado abaixo dos limites descritos na literatura, já que correspondeu apenas à amostra de três enfermeiras dentre os 202 profissionais coletados (SILVA et al., 2010b). Outro estudo realizado neste mesmo hospital, a colonização da equipe de enfermagem representou 25,8% e, mais uma vez, o percentual de MRSA foi considerado abaixo dos limites descritos na literatura, visto que atingiu um valor de 3,3% das amostras (SILVA et al., 2012).

Já em relação às infecções de pacientes internados na UTI de um hospital universitário de Recife foi relatada prevalência de 37,7% de *S. aureus*, das quais MRSA representavam 12,98% (CAVALCANTI et al., 2005).

Em Natal-RN, foi demonstrado a predominância do clone BEC e o surgimento de variantes multirresistentes do USA-800, devido ao fato de ser encontrado em pessoas adultas e idosos, diferindo da variante primeiramente descrita (SOUSA-JUNIOR et al., 2009).

Um estudo em um hospital universitário do Rio de Janeiro mostrou a presença de clones que circulam internacionalmente sugerindo a fácil disseminação mundial dessas estirpes (VIVONI ET AL., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade epidemiológica e genética e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à meticilina das amostras provenientes de secreção nasal de profissionais de saúde e amostras clínicas de pacientes internados nas UTIs, clínicas cirúrgicas e serviço de hemodiálise/nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco no ano de 2011.

3.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a ocorrência de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos em secreção nasal de profissionais de saúde e amostras clínicas de pacientes internados das UTIs, clínicas cirúrgicas e serviço de hemodiálise/nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco no período de abril a agosto do ano de 2011.
- Identificar e selecionar amostras resistentes à meticilina (MRS).
- Detectar o gene *mecA* nas amostras classificadas como MRS através de métodos fenotípicos.
- Descrever o perfil de susceptibilidade dos isolados de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos que foram positivos para a presença do gene *mecA* frente a diversos antimicrobianos.
- Identificar a presença de clones dentre as amostras dos pacientes e dos profissionais.
- Identificar isolados resistentes à vancomicina.
- Descrever os dados clínico-epidemiológicos das amostras MRS dos pacientes e dos profissionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo tipo transversal descritivo. Este tipo de estudo é apropriado para descrever características das populações no que diz respeito a determinadas variáveis e os seus padrões de distribuição, em uma determinada população, em um dado período de tempo. Este estudo permitiu detectar a prevalência da colonização pelo *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo nos profissionais de saúde que atendem nas unidades de terapia intensiva, clínicas cirúrgicas e serviço de hemodiálise/nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), identificar grupos nesta população que estão susceptíveis, além de descrever as características relacionadas à amostra dos profissionais como: gênero, idade, setor que trabalha, tempo de exercício na profissão, tempo de exercício no setor, uso de equipamentos de proteção individual e quantidade de hospitais que trabalham.

Da mesma forma, foi possível detectar a presença de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo nas amostras dos pacientes provenientes das unidades de terapia intensiva, clínicas cirúrgicas e serviço de hemodiálise/nefrologia do HC-UFPE e descrever algumas características relacionadas a essas amostras como: gênero e tipo de amostra.

Permitiu ainda determinar o perfil de sensibilidade das linhagens de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo aos antibióticos de cada classe, além de determinar a presença de MRS nos setores acima descritos, bem como identificar clones dentre as amostras.

A descrição da distribuição de um agravo de saúde em uma população é uma das fontes imprescindíveis para o planejamento e administração de ações voltadas para a prevenção, tratamento e reabilitação, tanto em nível coletivo como individual.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado nos setores da unidade de terapia intensiva geral (UTI geral), clínica cirúrgica e serviço de hemodiálise/nefrologia do HC vinculado à UFPE, pois de acordo com a literatura consultada na área, estes corresponderiam aos setores de risco para a presença de MRS.

Todas as amostras oriundas dos profissionais de saúde foram processadas no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE e a maioria das amostras de

pacientes foram processadas no Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas, exceto àquelas que foram coletadas diretamente dos pacientes pela pesquisadora após a assinatura do TCLE. Todos os testes fenotípicos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE e as etapas de PCR e tipagem molecular foram realizadas no Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

4.3 População do estudo

Foram estudados todos os pacientes e profissionais de saúde oriundos dos setores de UTI geral, clínica cirúrgica e serviço de hemodiálise/nefrologia do HC-UFPE que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme o modelo em anexo (APÊNDICE A e APÊNDICE C) durante o período de abril a agosto do ano de 2011.

4.4 Categorização das variáveis

4.4.1 Variável dependente

- Colonização: Definida como presença de micro-organismo da espécie *S. aureus* ou *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina no espécime analisado. Categorizada como: Sim ou Não.

4.4.2 Variáveis independentes para profissionais de saúde

- Gênero: Masculino ou Feminino
- Idade: Definida como o intervalo de tempo entre a data de nascimento e a data da coleta. Categorizada como: <20 anos, 20 a 28 anos, 29 a 33 anos, 34 a 44 anos, 45 a 60 anos e >60 anos.
- Atividade profissional: Definida com atividade desenvolvida no hospital. Categorizada como: (1) Técnico Enfermagem, (2) Enfermeiro, (3) Médico e (4) Outros
- Setor que trabalha: Definida como unidade do hospital na qual o profissional desenvolve suas atividades, sendo categorizada como: (1) UTI, (2) Clínicas Cirúrgicas e (3) Hemodiálise/Nefrologia

- Tempo de exercício na profissão: Definida como o intervalo de tempo entre a data da primeira vez que o profissional começou suas atividades profissionais e a data da coleta. Categorizada como: 0 a 5 anos, 5 a 10 anos, 10 a 15anos, 15 a 20anos e ≥ 20 anos.
- Tempo de exercício no setor: Definida como o intervalo de tempo entre a data da primeira vez que o profissional começou a atividade no setor e a data da coleta. Categorizada como: 0 a 3 anos, 4 a 7 anos, 8 a 11 anos, 12 a 15 anos, 16 a 19 e ≥ 20 anos.
- Uso de equipamentos de proteção individual (EPIs): Definido como a frequência de utilização de todos os equipamentos de proteção individual (avental ou jaleco, luvas de procedimento e máscara) durante as atividades. Categorizada como: Sempre (em todas as situações de contato com o paciente); Às vezes (Apenas em situações que manipulem fluidos biológicos como sangue e secreções e/ou quando o paciente apresentar sintomas de doenças infecto-contagiosas) ou Nunca (não utiliza todos os EPIs em nenhuma situação)
- Equipamentos de proteção individual utilizados com maior frequência. Categorizada como:
 - 1-Todos (Jaleco, luva e máscara)
 - 2-Nenhum
 - 3-Jaleco
 - 4-Luva
 - 5-Máscara
 - 6-Luva + jaleco
 - 7-Luva+ máscara
 - 8-Máscara + jaleco
- Quantidade de hospitais que trabalha: Definida como número de unidades hospitalares diferentes do hospital estudado, nas quais o profissional desenvolve suas atividades profissionais. Categorizada como: 1, 2, e ≥ 3 .

4.4.3 Variáveis independentes para pacientes

- Setor de Internação: Definida como unidade do hospital no qual o paciente está internado. Categorizada como: (1) UTI, (2) Clínicas Cirúrgicas e (3) Hemodiálise/Nefrologia

- Área colonizada: Definida como o lugar no qual o micro-organismo foi isolado.

Categorizada como:

- 1-Ponta de cateter
- 2-Secreção de dreno
- 3-Sangue
- 4-Abscesso
- 5-Ferida operatória
- 6-Secreção traqueal
- 7-Secreções diversas.

4.5 Operacionalização da pesquisa

4.5.1 Coleta do material biológico

As amostras de secreção nasal dos profissionais de saúde foram coletadas pela pesquisadora com swabs estéreis e introduzidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), sendo assim, transportadas para o Laboratório de Bacteriologia, Departamento Medicina Tropical/UFPE.

As amostras dos pacientes foram coletadas de acordo com os procedimentos padrões, utilizados no HC-UFPE para ponta de cateter, drenos, sangue, ferida operatória, secreção traqueal dentre outras. Os pacientes que não apresentavam nenhuma área com característica de infecção foram submetidos à coleta de swab nasal pela pesquisadora, e os demais foram submetidos à coleta de material como parte da rotina médica pelos enfermeiros e/ou médicos. Nesse caso, os isolados foram obtidos após repique do material processado no Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas, através de semeio em Ágar Casoy e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia, Departamento Medicina Tropical/UFPE.

4.5.2 Isolamento e identificação do *Staphylococcus*

Após a coleta, as amostras de swab nasal foram inoculadas em Ágar sangue de carneiro 5% e incubadas 24-48 horas, a 37°C. As colônias com características macroscópicas de pertencerem ao gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram, e quando confirmadas pela morfologia e coloração, foram submetidas à identificação através dos testes de Catalase, Coagulase, DNase e fermentação de Manitol. As demais amostras de secreções

dos pacientes foram semeadas em Ágar sangue de carneiro 5% e Ágar MacConkey, e posteriormente identificadas de acordo com os procedimentos padrões (KONEMAN et al., 2001).

4.5.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Após identificação, foi realizado antibiograma dos isolados de *Staphylococcus* pela técnica de disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2010) utilizando os seguintes antimicrobianos: penicilina 10U, oxacilina 1µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, clindamicina 2µg, sulfametaxazol-trimetropim 1,25/23,75µg ciprofloxacina 5µg, cloranfenicol 30µg, cefoxitina 30µg, teicoplanina 30µg, eritromicina 15µg e linezolid 30µg. Foi realizada a leitura dos halos de inibição formados utilizando paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros com os padrões descritos no CLSI, 2010.

4.5.4 *Screening* de oxacilina

Após a realização do antibiograma, selecionou-se isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina. Após seleção dos isolados, foi feita suspensão direta das colônias que estavam em Ágar sangue de carneiro 5%, em caldo BHI, para obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 da escala de McFarland. Mergulhou-se uma alça de platina de 1µL nessa suspensão, semeando-a em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo o meio Ágar Mueller Hinton com NaCl (4% v/v; 0,68 mol/L) acrescido de 6 µg/mL de oxacilina. Estas placas foram incubadas a 35°C por 24 horas sendo considerados, após leitura dos resultados como: >1 colônia = resistente (CLSI, 2010). Foi utilizado como controle de qualidade as cepas padrão para MRSA e MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – Sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente (PEREZ; D´AZEVEDO, 2008).

4.5.5 Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras de *Staphylococcus* (MRS) foi utilizada a técnica de FREITAS et al. (2008), na qual o DNA foi extraído a partir de 1mL de cultura bacteriana previamente crescida em caldo BHI a 37°C por 24h, centrifugada a 14,000rpm/4°C. Ao sedimento é adicionado 500µL de TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM), 10µL de lisozima (10mg/mL) e 10µL de proteinase K (5mg/mL). A suspensão foi incubada a 60°C por 20 min seguido da adição de 100µL de STE (2,5% SDS; 10mM Tris-HCl, pH 8; 0,25mM EDTA) e incubação por 15min a 60°C, seguido de 5min na temperatura ambiente e 5min no banho com gelo. A reação foi neutralizada com 130µL de 7,5M de acetato de amônio, permanecendo no banho com gelo por 15min e depois centrifugado por 5min. Aproximadamente 700µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo e misturado ao mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de centrifugação por 5min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA precipitado em aproximadamente 420µL de isopropanol a -70°C por 30min ou -20°C por 24h. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 10µL de RNase (0,2mg/mL) e estocado a -20°C.

O DNA de todos os isolados após a extração foi quantificado por comparação com quantidade conhecida do DNA do fago *lambda* clivado com enzima *Hind* III(Sigma). Uma alíquota de 1 ou 2 µL do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002) à temperatura ambiente sob corrente constante. Após migração, o DNA foi corado e observado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e registrado em um sistema de foto documentação Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA).

4.5.6 Identificação de *mecA* por PCR

Para a amplificação foram utilizados os *primers* P1, 5'-GGTCCCATTA ACTCTGAAG-3' e P3, 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' descritos por PETINAKI, et al. (2001a) que resultam em fragmentos de 1.046bp. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente

para 35 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio (2µg/mL), visualizado em transluminador UV e digitalizado através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

4.5.7 Ribotipagem - PCR

As amostras que apresentaram resultados positivos para a presença do gene *mecA* foram submetidas à Ribotipagem- PCR.

A discriminação entre as estirpes de *Staphylococcus spp.* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por CUNY et al. (1996). Para a amplificação das regiões espaçadoras entre os genes do rRNA 16S-23S foram utilizados os primers rRNA1 (5'- TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3') e rRNA2 (5'- GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3').

As reações de amplificação consistiram em 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil), para um volume final de 25µL em cada tubo. As condições de amplificação compreenderam 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose em concentração de 2%, corado com brometo de etídio (2µg/mL) e, como padrão de peso molecular, foi utilizado o Ladder 100bp (Invitrogen), para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

4.5.8 *Screening* de Vancomicina

Os isolados que foram positivos para a presença do gene *mecA* através da PCR foram submetidas à *screening* de vancomicina. Desta forma, essas amostras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 48 horas a 35°C a fim de se obter uma turbidez equivalente a uma

solução padrão 2 da escala de McFarland. Mergulhou-se uma alça de platina de 1µL nessa suspensão e procedendo com o inóculo em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo o meio Ágar BHI suplementado com 6 µg/mL de vancomicina (OXOID). Estas placas foram incubadas a 35 °C por 24 e 48 horas sendo considerados, após leitura dos resultados como: >1 colônia = resistente (NUNES et al., 2007; BURNHAM et al., 2010; CLSI, 2010; HOWDEN et al., 2010).

Foi utilizado como controle de qualidade as cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistente (CLSI, 2010).

4.6 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco- CEP/CCS/UFPE com o registro Nº 009/11 (ANEXO A).

4.7 Análise estatística

Os dados clínicos e microbiológicos (APÊNDICE B e APÊNDICE D) foram analisados estatisticamente, através da distribuição de frequências, utilizando o software Epi Info versão 6.04.

5 . ARTIGO

Artigo a ser submetido à Revista *Current Microbiology*

OCORRÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DE *Staphylococcus* RESISTENTES À METICILINA EM AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL.

Marcelle Aquino Rabelo¹, Armando Monteiro Bezerra Neto¹, Stéfany Ojaimi Loibman¹, Jailton Lobo da Costa Lima¹, Ewerton Lucena Ferreira², Nilma Cintra Leal², Maria Amélia Vieira Maciel¹.

¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM- FIOCRUZ – Recife, Pernambuco, Brasil.

Endereço para Correspondência:

Marcelle Aquino Rabelo

Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50670-901

e-mail:marcelleaquino@yahoo.com.br

Resumo: A disseminação de *Staphylococcus* resistentes à meticilina em serviços hospitalares é muitas vezes atribuída a profissionais de saúde. O presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade epidemiológica, genética e a susceptibilidade antimicrobiana de MRS das amostras provenientes de secreção nasal de profissionais de saúde e amostras clínicas de pacientes internados nas UTIs, hemodiálise/nefrologia e clínicas cirúrgicas de um hospital universitário de Recife-Brasil. Foram coletadas amostras de 91 pacientes internados nesses setores e 120 profissionais que trabalhavam nos mesmos, a fim de realizar isolamento e identificação de *Staphylococcus spp.* Estas amostras foram submetidas a testes de susceptibilidade antimicrobiana, detecção do gene *mecA* e avaliadas quanto a presença de clones por ribotipagem-PCR. Assim, MRS (*Staphylococcus* resistente à meticilina) foi prevalente entre os técnicos de enfermagem, 48,15% (13/27) dentre as amostras positivas, e 40,74% (11/27) dos isolados oriundos dos profissionais de saúde foram das clínicas cirúrgicas. Nos pacientes, a maior ocorrência de isolados *mecA* positivos esteve entre as amostras de ponta de cateter, representando 33,33% (3/9) das amostras positivas, coletadas em sua maioria na hemodiálise/nefrologia. Foram encontrados oito isolados resistentes à vancomicina, dentre os MRS, através do *screening* de vancomicina. Com base nos padrões de amplificação, descreveu-se 23 ribotipos, sendo um deles encontrado em uma amostra de um paciente e de um enfermeiro. Desta forma, o conhecimento do perfil fenotípico e molecular de amostras de *Staphylococcus* pode contribuir para orientar a conduta terapêutica no tratamento e controle das infecções hospitalares.

Palavras-chave: MRS, pacientes, profissionais de saúde, clones.

Introdução

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são responsáveis por uma grande diversidade de problemas de saúde, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardites e bacteriemias adquiridas em hospitais [16]. Esta bactéria permanece como um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas de origem comunitária e hospitalar, e, com o advento da resistência à meticilina, por volta da década de 60, passou a receber atenção especial, principalmente no que diz respeito a seu controle de disseminação, visto que a partir de então as opções terapêuticas passaram a ser cada vez mais limitadas [19, 38].

Essa resistência à meticilina é determinada, na grande maioria das vezes, pela presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mecA*, que é responsável pela síntese de uma proteína ligadora de penicilina (PBP), a qual atua na síntese da parede celular bacteriana e é conhecida como PBP2a ou PBP2' [29]. Este gene é amplamente distribuído entre os *S. aureus* e entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo e sua detecção por métodos moleculares é considerada o método “*gold standard*” para avaliação qualitativa da resistência à meticilina [30, 31, 36]. Sabe-se que a PBP2a tem baixa afinidade não só para a meticilina como para os outros antibióticos betalactâmicos [19, 29].

Profissionais de saúde são portadores dessa bactéria, em decorrência de diversos fatores, dentre eles, a vulnerabilidade conferida no cotidiano do trabalho, e alguns estudos sugerem que eles atuam como disseminadores [2, 32, 35]. A nasofaringe é considerada o local de colonização mais frequente por MRSA [28, 34] e a sua identificação é considerada como uma estratégia preventiva que permite a redução da incidência de infecções por este micro-organismo [28]. Dessa forma, a identificação de portadores de MRSA é um passo para o estabelecimento de uma política de controle, ajudando a identificar as medidas necessárias para reduzir a pressão da colonização [28] e o conhecimento do perfil epidemiológico-molecular das doenças causadas por essas bactérias poderá auxiliar na elaboração de estratégias de controle mais eficientes para a redução da infecção, uma vez que, a partir dos perfis moleculares, pode-se inferir relações genéticas entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção [24, 28].

Assim, sistemas apropriados de tipagem são necessários para determinar a estrutura genética dos isolados, proporcionando uma estratégia efetiva de controle epidemiológico e o método de tipagem, denominado ribotipagem-PCR, tem-se mostrado de alto valor taxonômico e epidemiológico. Essa técnica constitui valiosa ferramenta para identificar e diferenciar isolados do gênero estafilococos, sendo útil para epidemiologia molecular podendo ser utilizado para discriminar clones e linhagens clonais [10, 18, 24].

Apesar da relevância desses micro-organismos como importantes patógenos associados a infecções nosocomiais, estudos que fornecem dados sobre a colonização dos trabalhadores de saúde, principalmente avaliações multi-profissionais em Pernambuco, aliados à sua correlação com os clones causadores de tais infecções ainda são escassos. Diante disto, o presente trabalho objetivou descrever a diversidade epidemiológica, genética e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* das amostras provenientes de secreção nasal de profissionais de saúde e amostras clínicas de pacientes internados nas UTIs, hemodiálise/nefrologia e clínicas cirúrgicas de um hospital universitário da cidade do Recife, analisando os dados epidemiológicos e moleculares das linhagens bacterianas MRS, a fim de fornecer subsídios para promoção de ações de controle no hospital.

Materiais e métodos

Coleta do material biológico

Foram incluídos no estudo todos os pacientes (com exceção de dois pacientes que vieram à óbito antes de serem incluídos no estudo e dois pacientes cujos responsáveis não autorizaram a coleta de amostras) e todos os profissionais de saúde (exceto cinco profissionais que se recusaram a participar) dos setores de UTI geral, clínica cirúrgica e serviço de hemodiálise/nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco durante o período de abril a agosto do ano de 2011.

Dos profissionais de saúde foram coletadas amostras da cavidade nasal com auxílio de swabs estéreis após a assinatura de TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e resposta à questionário sobre informações a respeito de suas atividades profissionais. Essas amostras foram introduzidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia, Departamento Medicina Tropical/UFPE.

As amostras dos pacientes foram coletadas de acordo com os procedimentos padrões, utilizados no hospital para ponta de cateter, drenos, sangue, abscesso, ferida operatória, secreção traqueal dentre outras e os isolados obtidos após cultura no laboratório de bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Os pacientes que não apresentavam nenhuma área com característica de infecção foram submetidos à coleta de swab nasal, após assinatura de TCLE.

Isolamento e identificação do *Staphylococcus*

Após a coleta, as amostras de swab nasal foram inoculadas em Ágar sangue de carneiro 5% e incubadas 24-48 horas, a 37°C. As colônias com características macroscópicas do gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram, e quando confirmadas pela morfologia e coloração, foram submetidas à identificação através dos testes de Catalase, Coagulase, DNase e fermentação de Manitol. As demais amostras de secreções dos pacientes foram semeadas de acordo com protocolo padrão em Ágar sangue de carneiro 5% e Ágar MacConkey, porém, apenas as colônias com características do gênero *Staphylococcus* foram identificadas [17].

Susceptibilidade aos antimicrobianos

Após identificação, foi realizado antibiograma dos isolados de *Staphylococcus*, para determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos, pela técnica de disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton [5] utilizando: penicilina 10U, oxacilina 1µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, clindamicina 2µg, sulfametaxazol-trimetropim 1,25/23,75µg ciprofloxacina 5µg, cloranfenicol 30µg, cefoxitina 30µg, teicoplanina 30µg, eritromicina 15µg e linezolide 30µg. Foi realizada a leitura dos halos de inibição formados utilizando paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros com os padrões descritos no CLSI, 2010.

Screening de oxacilina

Após a realização do antibiograma, selecionou-se isolados que apresentaram resistência a oxacilina e/ou cefoxitina. Após seleção dos isolados, foi feita suspensão direta das colônias que estavam em Ágar sangue de carneiro 5%, em caldo BHI, para obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 da escala de McFarland. Mergulhou-se uma alça de platina de 1µL nessa suspensão, semeando-a em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo o meio Ágar Mueller Hinton com NaCl (4% v/v; 0,68 mol/L) acrescido de 6 µg/mL de oxacilina. Estas placas foram incubadas a 35°C por 24 horas sendo considerados, após leitura dos resultados como: >1 colônia = resistente [5]. Foi utilizado como controle de qualidade as cepas padrão para MRSA e MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – Sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente.

Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras de *Staphylococcus* (MRS) foi utilizada a técnica de Freitas et al [11].

Identificação de *mecA* por PCR

Para a amplificação foram utilizados os *primers* P1, 5'-GGTCCCATTAAGTCTGAAG-3' e P3, 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' descritos por Petinaki et al [27] que resultam em fragmentos de 1.046bp. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 35 ciclos térmicos, um minuto a 94°C, um minuto a 55°C e dois minutos a 72°C seguido de uma etapa final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (2µg/mL), visualizado em transluminador UV e digitalizado através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

Ribotipagem - PCR

As amostras que apresentaram a presença do gene *mecA* foram submetidas à Ribotipagem- PCR. A discriminação entre as estirpes de *Staphylococcus spp.* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cuny et al [6]. Para a amplificação das regiões espaçadoras entre os genes do rRNA 16S-23S foram utilizados os primers rRNA1 (5'- TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3') e rRNA2 (5'- GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3').

As reações de amplificação consistiram em 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP 200 μ M, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5 μ L do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil), para um volume final de 25 μ L em cada tubo. As condições de amplificação compreenderam 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose em concentração de 2%, corado com brometo de etídio (2 μ g/mL) e, como padrão de peso molecular, foi utilizado o Ladder 100bp (Invitrogen), para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Screening de Vancomicina

Os isolados que foram positivos para a presença do gene *mecA* através da PCR foram submetidas à *screening* de vancomicina. Foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 48 horas a 35°C a fim de se obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão 2 da escala de McFarland. Mergulhou-se uma alça de platina de 1 μ L nessa suspensão e procedendo com o inóculo em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo o meio Ágar BHI suplementado com 6 μ g/mL de vancomicina (OXOID). Estas placas foram incubadas a 35°C por 24 e 48 horas sendo considerados, após leitura dos resultados como: >1 colônia = resistente [3,56, 15, 22]. O controle de qualidade utilizado foi: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistente.

Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco-CEP/CCS/UFPE com o registro N° 009/11.

Análise estatística

Os dados clínicos e microbiológicos foram analisados estatisticamente utilizando o software Epi Info versão 6.04. através da distribuição de frequências.

Resultados

Foram coletadas amostras de 120 profissionais de saúde, entre médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, fisioterapeutas, nutricionistas e psicólogos (Tabela 2) e de 91 pacientes dos setores de UTI, Clínicas cirúrgicas e hemodiálise/nefrologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco no período de abril a agosto do ano de 2011.

Neste estudo, a prevalência de MRS foi maior em indivíduos do sexo feminino em comparação com o sexo masculino. Em relação à faixa etária, observou-se que os indivíduos com idade entre 20 e 28 anos foram os mais colonizados por MRS, sendo estes micro-organismos mais prevalentes entre os técnicos de enfermagem, representando 48,15% dentre as amostras positivas. As clínicas cirúrgicas representaram o setor de maior ocorrência de isolados positivos, com um percentual de 40,74% entre os isolados oriundos dos profissionais de

saúde. A prevalência de MRS também foi alta (77,78%) entre os indivíduos que utilizavam simultaneamente o jaleco, luva e máscara apenas em situações específicas de contato com fluidos ou secreções de pacientes, e o grupo que relatou que dentre os EPIs disponíveis, utilizava com mais frequência o jaleco, a luva e a máscara juntos, também foi o mais colonizado por MRS (29,63%). A ocorrência de MRS também foi mais alta entre os profissionais que exerciam suas atividades durante o período diurno quando comparados com aqueles que exerciam suas funções durante a noite, sendo a mesma também maior naqueles indivíduos que tinham entre 1 e 5 anos de profissão e trabalham naquele setor a menos de 1 ano. A frequência de isolamento de amostras resistentes foi similar entre os indivíduos que trabalhavam apenas no hospital estudado e aqueles que trabalhavam em mais um hospital (Tabela 2).

Foi obtida uma amostra de cada paciente e, após os testes de identificação, foram isoladas 30 bactérias do gênero *Staphylococcus*. O tipo mais frequente de amostra de pacientes foi cultura de sangue (37,36%), seguida de ponta de cateter (11%) e, ao todo, foram obtidas 11 culturas negativas (Tabela 1).

Os isolados, de pacientes, classificados como do gênero *Staphylococcus* foram identificadas como 11 *Staphylococcus* coagulase negativo e 19 *S. aureus*. Através do teste de disco-difusão de oxacilina e/ou cefoxitina, selecionou-se amostras de 21 de *Staphylococcus spp.* resistentes para serem submetidas à detecção do gene *mecA*, obtendo-se após esta etapa nove amostras positivas. Cabe ressaltar que os isolados de *Staphylococcus spp.* dos profissionais de saúde também foram submetidas à este teste, selecionando-se 63 resistentes que consistiram em 27 isolados positivos para este gene, as quais juntamente com os de pacientes, totalizam 36 isolados MRS (Tabela 3).

A maior ocorrência de isolados *mecA* positivos nas amostras de pacientes foi entre as amostras de ponta de cateter (33,33%) (Tabela 1) e o setor de origem mais frequente para isolados positivos nesse grupo foi a Hemodiálise/nefrologia (44,44%) (Tabela 4).

Das amostras submetidas à *screening* de oxacilina 61,9% foram resistentes, porém essa técnica só identificou 75% dos isolados positivos para o gene *mecA* (Tabela 5). Da realização do *screening* de vancomicina, observou-se que oito isolados apresentaram-se como resistentes (Tabela 6).

Em relação ao antibiograma dos isolados positivos para o gene *mecA*, observou-se que os antibióticos cloranfenicol, linezolida e vancomicina atingiram os maiores percentuais de sensibilidade, correspondendo a 80,56%, 91,67% e 72,22% dos isolados, respectivamente e 58,33% dos isolados foram resistentes à ciprofloxacina (Figura 1).

Nas reações de ribotipagem-PCR, foram observados de dois a quatro fragmentos de tamanho aproximado de 500 a 900 pb. Com base nos padrões de amplificação, os 36 isolados foram classificados em 23 ribotipos, denominados neste trabalho de R1 a R23 (Figura 3). Seis isolados de *S. aureus* (quatro de pacientes e dois de profissionais) foram distribuídos em quatro ribotipos (R1, R6, R7, R8). Já os SCoN (*Staphylococcus* coagulase negativos) isolados de cinco pacientes apresentaram outros quatro ribotipos diferentes (R5, R10, R11, R12); 25 isolados de profissionais distribuídos em 17 ribotipos, com prevalência dos ribotipos R2 (cinco isolados), R3 (três isolados), R4 e R6 (dois isolados). Os ribotipos R7, R9, R13 a R23 ocorreram em apenas um isolado cada (Tabela 7). O perfil R7 foi encontrado em *S. aureus* procedente de amostra de ponta de cateter de um paciente e um SCoN de um enfermeiro, de setores hospitalares diferentes.

Discussão

Os estafilococos são considerados um problema crescente nas unidades hospitalares, sendo referido como um dos principais agentes de bacteriemia adquirida nesse ambiente, principalmente após os primeiros relatos de casos de resistência à metilicina [16]. Em muitos hospitais brasileiros, a prevalência de isolamento de cepas de MRSA varia de 40 a 80% [23, 28, 37] e os dados do Programa de Vigilância a Antimicrobianos mostram que MRSA corresponde a 31% da causa de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo considerado o mais comum dentre os patógenos mais prevalentes [12]. Neste estudo, a prevalência de *Staphylococcus* resistente à metilicina foi 22,5% (27/120) para profissionais de saúde e 9,89% (9/91) para pacientes, porém, para ambas categorias, esses grupos foram compostos principalmente por *Staphylococcus* coagulase negativo que apresentaram percentuais de 20,83% e 5,5%, respectivamente. Esse percentual encontrado foi baixo, pois segundo levantamento do SENTRY feito em hospitais brasileiros a resistência dos SCoN em hemoculturas é de 80% [12].

Em relação às infecções de pacientes internados na UTI de um hospital universitário de Recife foi relatada prevalência de colonização de 37,7% por *S. aureus*, das quais MRSA representavam 12,98% [4], semelhante ao percentual de 10% (3/30) para MRS obtido para esse setor. Em relação à equipe de saúde, um estudo realizado em um hospital universitário de Londrina, a colonização por *S. aureus* em membros da equipe médica foi próxima a normalmente encontrada na comunidade: 17,68%, sendo 1,19% portadores de MRSA [14], inferior ao percentual de colonização por MRS de 23,08% (6/26) encontrado. Em um estudo realizado num hospital universitário de Recife, a colonização dos profissionais de saúde atingiu 25,7%, porém o percentual de MRSA foi considerado abaixo dos limites descritos na literatura, já que correspondeu apenas à amostra de três enfermeiras dentre os 202 profissionais coletados [34], estando dessa forma, abaixo do percentual que encontramos no que diz respeito à MRSA. Outro estudo realizado neste mesmo hospital, a colonização da equipe de enfermagem representou 25,8% e, mais uma vez, o percentual de MRSA foi considerado abaixo dos limites descritos na literatura, visto que atingiu um valor de 3,3% das amostras [35].

Estudo realizado em um hospital escola do interior de São Paulo sugeriu que os enfermeiros e técnicos de enfermagem correspondem a classe profissional mais colonizada por MRSA, com uma prevalência de 7,1% [21] semelhante ao percentual de 10,83% encontrado dentre os técnicos de enfermagem.

A faixa etária de ocorrência de MRS dentre os profissionais de saúde, foi a mesma descrita em outros trabalhos realizados no mesmo hospital em anos anteriores [33, 34, 35]. Assim, a frequência de MRS foi maior na faixa etária de 20 a 28 anos, e esses mesmos trabalhos sugerem que isso pode ser devido a necessidade de consolidar alguns conceitos da prática profissional como lavagem das mãos antes e depois dos procedimentos e o contato das mesmas com as narinas. Esta mesma deficiência na prática profissional também poderia justificar a maior ocorrência no grupo cujo tempo profissão situa-se entre 1 e 5 anos.

Os outros dados encontrados divergem dos estudos anteriores realizados no mesmo hospital [33, 34, 35], principalmente porque o foco dos mesmos era apenas *S. aureus* e não foram realizadas caracterizações moleculares, entretanto, os antibimicrobianos de escolha continuariam os mesmos, linezolid, cloranfenicol e vancomicina. Neste caso, a susceptibilidade a esse glicopeptídeo foi determinada através do teste de disco-difusão, apesar de estudos apontarem que a resistência à vancomicina deve ser determinada através de técnicas

mais sensíveis tais como *screening* em placa, E-test, microdiluição e detecção genotípica [3, 5, 15, 22], ela ainda é utilizada em muitos hospitais públicos do país.

No Brasil, a resistência intermediária à vancomicina em pacientes tem sido descrita, porém poucos relatam a colonização de profissionais de saúde por essas cepas [25], sendo descritos três isolados resistentes à vancomicina através de E-test e microdiluição. Dentre as amostras MRS, foram encontrados oito isolados resistentes à vancomicina pelo método de *screening*, e apenas uma correspondia a isolado originado de hemocultura de paciente, os demais foram oriundos de amostras de profissionais.

Foi observada a ocorrência de amostras resistentes à metilicina apenas pelos métodos fenotípicos, por exemplo, no *screening* de oxacilina, o que sugere a presença de outros mecanismos de resistência independentes do gene *mecA* [7, 27, 41].

Alguns trabalhos que utilizam a ribotipagem-PCR apresentam também amplo polimorfismo, como em nosso estudo, considerando o número de ribotipos observados, indicando dispersão nos setores do hospital [20, 26].

Nas reações de ribotipagem-PCR, apenas o R7 foi observado em uma amostra de um paciente da hemodiálise/nefrologia (*S. aureus*) e em uma enfermeira da clínica cirúrgica (*Staphylococcus coagulase* negativo), sendo este o único dentre os ribotipos que esteve presente em amostra de paciente e de profissional de saúde, sugerindo uma baixa disseminação entre essas classes.

A presença dos mesmos clones entre pacientes e profissionais, foi analisada em um estudo através da utilização de PFGE sugerindo a importância dos profissionais de saúde em surtos de infecções hospitalares [2]. A técnica de ribotipagem-PCR aqui utilizada tem a vantagem de ser menos propensa a variações por caracterizar uma região essencial ao crescimento bacteriano e portanto mais estável, ser específica e realizada sob condições de alta estridência [10, 18, 24] e mesmo assim não aponta os profissionais de saúde como fonte de transmissão, uma vez que são portadores de diversos clones não encontrados em pacientes.

Essas técnicas foram úteis para trazer novamente a questão sobre o papel do profissional de saúde na disseminação da infecção hospitalar e apesar de não ser confirmada a contribuição dos profissionais de saúde na disseminação de cepas resistentes [1, 13], diversos trabalhos com base em técnicas moleculares sugerem esse veículo de disseminação [2, 8, 9]. A diversidade de ribotipos encontrados, apesar da estabilidade da região espaçadora (ITS) 16S-23S, mostra a presença de vários clones circulantes no hospital no período estudado, portanto é possível que existam várias fontes de contaminação, principalmente quando observamos que apenas um clone esteve presente em paciente e profissional. Talvez esse fato seja devido a utilização dos três EPI em situações de contato com os fluidos e secreções dos pacientes, já que a amostra de maior ocorrência de MRS foi a ponta de cateter.

A busca de forma rotineira, por profissionais colonizados por MRSA, não é aconselhada, e, da mesma forma, a sua descolonização, principalmente devido ao custo associado [1], apenas em situações nas quais os dados epidemiológicos sugerem esta fonte de transmissão [2, 32], ou como último recurso para a contenção de transmissão, quando outras medidas já foram tomadas em um surto [39]. Nessas situações, a identificação de portadores de MRS consiste num passo para o estabelecimento de uma política de controle e ajuda na identificação das medidas necessárias para reduzir a pressão da colonização [28].

Agradecimentos

À FACEPE (Fundação de Amparo Ciência do Estado de Pernambuco) pela utilização de recursos do projeto APQ 0579-2.12/07 e à PROPESQ (Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação-UFPE) pelo Edital PQ-Multiusuário-2010/Propesq de número 23076.024115/2010-91. Ao laboratório de bacteriologia do Hospital das Clínicas pela concessão de algumas amostras e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) pelo desenvolvimento do projeto.

Referências

1. Albrich WC, Harbarth S (2008) Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infect Dis* 8: 289-301.
2. Ben-David D, Mermel LA, Parenteau S (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. *Am J Infect Control* 36(2): 93-97.
3. Burnham CAD, Weber CJ, Dunne Jr WM (2010) Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 48(3): 949-951.
4. Cavalcanti SMM, França ER, Cabral C et al (2005) Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. *The Braz J Infect Dis* 9(1):56-63.
5. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2010) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S20. Wayne, PA, USA: CLSI.
6. Cuny C, Claus H, Witte W (1996) Discrimination of *S. aureus* by PCR for r-RNA gene spacer size polymorphism and comparison to SmaI macrorestriction patterns. *Zentralbl Bakteriol* 83: 466-476.
7. Cuny C, Layer F, Strommenger B et al (2011) Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS ONE* 6(9): e24360.
8. Eveillard M, Martin Y, Hidri N et al (2004) Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:114-120.
9. Eveillard M, De Lassence A, Lancien E et al (2006) Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital. *Infect Control Epidemiol* 27: 181-184.
10. Forsman P, TiIsala-Timisjarvi A, Alatossava T (1997) Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143: 3491-3500.
11. Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM et al (2008) Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. *Pesq Vet Bras* 28(12): 617-621.
12. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J et al (2009) Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 13(2):90-98.
13. Gordon R, Lowy FD (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46: 350-359.

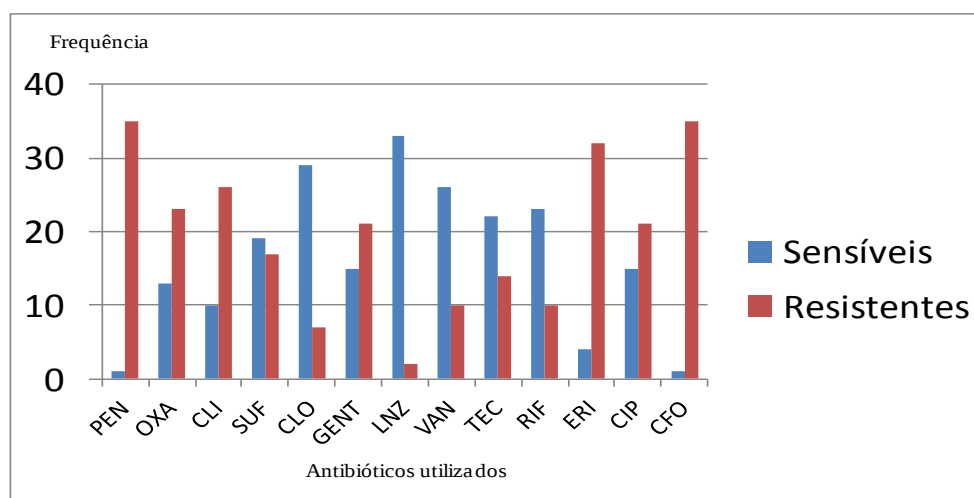
14. Heshiki Z, Quesada RMB, Heshiki RE et al (2002) Nasal bacteriological flora: a study among medical residents of Londrina University Hospital-Parana State-Brazil. *Semina: Ciências biológicas e da saúde*. 23:3-10.
15. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR et al (2010) Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 23(1): 99–139.
16. Kluytmans J, Struelens M (2009) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ* 12(1): 338-364.
17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM et al (2001) Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas colorido. 5ª ed. MEDSI. Rio de Janeiro p.551-579.
18. Kostman JR, Alden MB, Mair M et al (1995) A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J Infect Dis* 171: 204-208.
19. Martineau F, Picard FJ, Lansac N et al (2000) Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents and Chemother* 44(2):231-238.
20. McAleese F, Murphy E, Babinchak T et al (2005) Use of ribotyping to retrospectively identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials for tigecycline that are genotypically related to community-associated isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 45:21–4529.
21. Moura JP, Pimenta FC, Hayashida M et al (2011) Colonization of nursing professionals by *Staphylococcus aureus*. *Rev Lat-Am Enferm* 19(2):325-331.
22. Nunes APF, Schuenck RP, Bastos CCR et al (2007) Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. *The Braz J Infec Dis* 11(3): 345-350.
23. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE et al (2001) Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *J Infect Dis* 5:163-170.
24. Oliveira AM, Ramos MC (2002) PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz J Med and Biol Res* 35: 175-180.
25. Palazzo IC, Araujo ML, Darini AL (2005) First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 43: 179-85.
26. Pereira MSV, Leal NC, Leal TCA et al (2002) Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. *Lett Appl Microbiol* 35: 32-36.
27. Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G et al (2001) Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother* 47(3): 297-304.
28. Santos HB, Machado DP, Camey SA et al (2010) Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis*. 10: 328-334.
29. Schito GC (2006) The importance of development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 12(1):3-8.

30. Secchi C, Antunes ALS, Perez LRR et al (2008) Identification and detection of methicillin resistance in non-*epidermidis* coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis* 12(4): 316-320.
31. Shariati L, Validi M, Tabatabaiefar MA et al (2010) Comparison of Real-Time PCR with Disk Diffusion, Agar Screen and E-test Methods for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 61:520–524.
32. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M et al (2007) Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control* 35:165-193.
33. Silva ECBF, Antas MGC, Bezerra Neto AM et al (2008) Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* in health care workers at a University Hospital of Recife-PE. *The Braz J Infect Dis* 12(6):504-508.
34. Silva ECBF, Maciel MAV, Melo FL et al (2010) Epidemiological surveillance and susceptibility of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a reference hospital: preliminary assessment. *Rev Inst Adolfo Lutz* 69(1):126-130.
35. Silva ECBF, Samico TM, Cardoso RR et al (2012) Colonization by *Staphylococcus aureus* among the nursing staff of a teaching hospital in Pernambuco. *Rev Esc Enferm USP*. 46(1): 132-137.
36. Swenson JM, Lonsway D, McCallister S et al (2007) Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diag Microbiol Infect Dis* 38(5): 1346-1350.
37. Trindade PDA, Pacheco RL, Costa SF et al (2005) Prevalence of *SCCmec* type IV in nosocomial bloodstream isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol* 43: 3435-3437.
38. Tverdek FP, Crank CW, Segreti J (2008) Antibiotic Therapy of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Critical Care. *Crit Care Clin* 24: 249-260.
39. Wenzel RP, Reagan DR, Bertino JS et al (1998) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *Am J Infect Dis* 26(2):102-110.
40. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC et al (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus* infections. *Lancet Infect Dis* 5(12): 751-762.
41. Yoshida R, Kuwahara-Arai K, Baba T et al (2003) Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* 51:247-255.

Tabela 1: Distribuição dos isolados de *Staphylococcus spp.* por tipo de amostra.

TIPO DE AMOSTRA	Quantidade de <i>Staphylococcus</i> isolados	Outros micro-organismos isolados	Culturas negativas	TOTAL
Sangue	8 (2)	16	11	35
Ponta de Cateter	8 (3)	2	0	10
Líquido peritonial	1 (1)	0	1	2
Líquido pleural	0	0	1	1
Líquido de vesícula biliar	0	0	1	1
Secreção traqueal	3 (1)	6	0	9
Ferida operatória	1 (1)	4	0	5
Secreção de pele	3	1	0	4
Secreção de axila esquerda	1	0	0	1
Swab nasal	5 (1)	0	0	5
Urina	0	4	0	4
Secreção de orofaringe	0	1	0	1
Secreção de dreno	0	2	0	2
Secreção de cateter	0	4	0	4
Secreção de úlcera sacral	0	4	0	4
Secreção abdominal	0	1	0	1
Fragmento de tecido	0	1	0	1
Tumoração inguinal	0	1	0	1
TOTAL	30 (9)	47	14	91

Nota: os dados entre parêntesis correspondem ao número de isolados *mecA* positivos.

**Figura 1:** Perfil de susceptibilidade antimicrobiana das amostras MRS.

Nota: PEN=Penicilina; OXA=Oxacilina; CLI=Clindamicina; SUF=Sulfametoxazol/trimetopim; CLO=Cloranfenicol; GENT=Gentamicina; LNZ=Linezolida; VAN=Vancomicina; TEC=Teicoplanina; RIF=Rifampicina; ERI=Eritromicina; CIP=Ciprofloxacina; CFO=Cefoxitina.

<1 ano	25	20.84	4	14.81	21	22.58
1 - 5 anos	30	25.00	9	33.33	21	22.58
5 - 10 anos	22	18.33	4	14.81	18	19.36
10 - 15 anos	13	10.83	2	7.41	11	11.83
15 -20 anos	9	7.50	3	11.12	6	6.45
>20 anos	21	17.5	5	18.52	16	17.20
Tempo de exercício no setor						
<1 ano	54	45.00	11	40.74	43	46.24
1 -3 anos	25	20.83	7	25.93	18	19.35
3 -7 anos	12	10.00	3	11.11	9	9.68
7 -11 anos	12	10.00	2	7.41	10	10.75
11 -15 anos	5	4.17	0	0	5	5.38
15 -20 anos	8	6.67	4	14.81	4	4.30
>20 anos	4	3.33	0	0	4	4.30
Quantidade de hospitais que trabalha						
1	57	47.50	11	40.74	46	49.46
2	49	40.83	11	40.74	38	40.86
3	10	8.34	3	11.11	7	7.53
>3	4	3.33	2	7.41	2	2.15

Nota: A variável “Uso de equipamentos de proteção individual (EPIs)” para este estudo foi definida como a frequência de utilização de todos os equipamentos de proteção individual (avental ou jaleco, luvas de procedimento e máscara) durante as atividades. Categorizada como: Sempre (em todas as situações de contato com o paciente); Às vezes (Apenas em situações que manipulem fluidos biológicos como sangue e secreções e/ou quando o paciente apresentar sintomas de doenças infecto-contagiosas) ou Nunca (não utiliza todos os EPIs em nenhuma situação).

Tabela 3: Distribuição dos isolados *mecA* positivos por fonte de isolamento.

FONTE DE ISOLAMENTO	Espécie	Nº de isolados	TOTAL
PROFISSIONAIS	<i>S. aureus</i>	02	27
	SCoN	25	
PACIENTES	<i>S. aureus</i>	04	09
	SCoN	05	
TOTAL		36	36

Tabela 4: Distribuição dos isolados *mecA* positivos por setor de isolamento.

Setor de isolamento	Espécie	Nº de isolados	TOTAL
UTI	Paciente	03	10
	Profissional	07	
Clínica cirúrgica	Paciente	02	13
	Profissional	11	
Hemodiálise/nefrologia	Paciente	04	13
	Profissional	09	
TOTAL			36

Tabela 5: Resultados do *screening* de oxacilina distribuídos por fonte de isolamento.

Resultados do teste	Fonte de isolamento				Total
	Paciente		Profissional		
	<i>S. aureus</i>	SCoN	<i>S. aureus</i>	SCoN	
Resistente	6 (4)	9 (4)	3	34 (19)	52 (27)
Sensível	5	1 (1)	8 (2)	18 (6)	32 (9)
Total	11 (4)	10 (5)	11 (2)	55 (25)	84 (36)

Nota: os dados entre parêntesis correspondem ao número de isolados *mecA* positivos.

Tabela 6: Amostras resistentes no *screening* de vancomicina distribuídos por fonte de isolamento.

FONTE DE ISOLAMENTO	Espécie	Nº de isolados	TOTAL
PROFISSIONAIS	<i>S. aureus</i>	00	07
	SCoN	07	
PACIENTES	<i>S. aureus</i>	01	01
	SCoN	00	
TOTAL			08

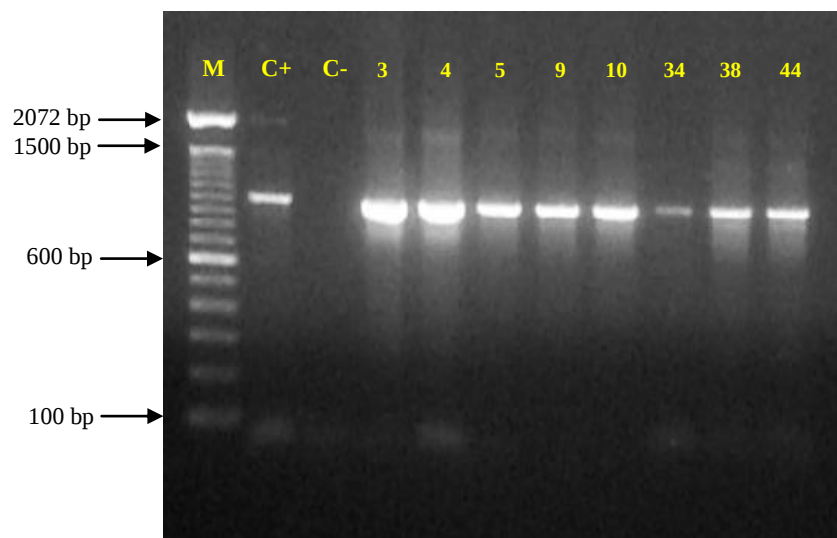


Figura 2: Gel de agarose 1% representativo das amplificações por PCR do gene *mecA*. Amostras positivas.
Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*). Linha C+, Controle positivo. Linha C-, Controle negativo.

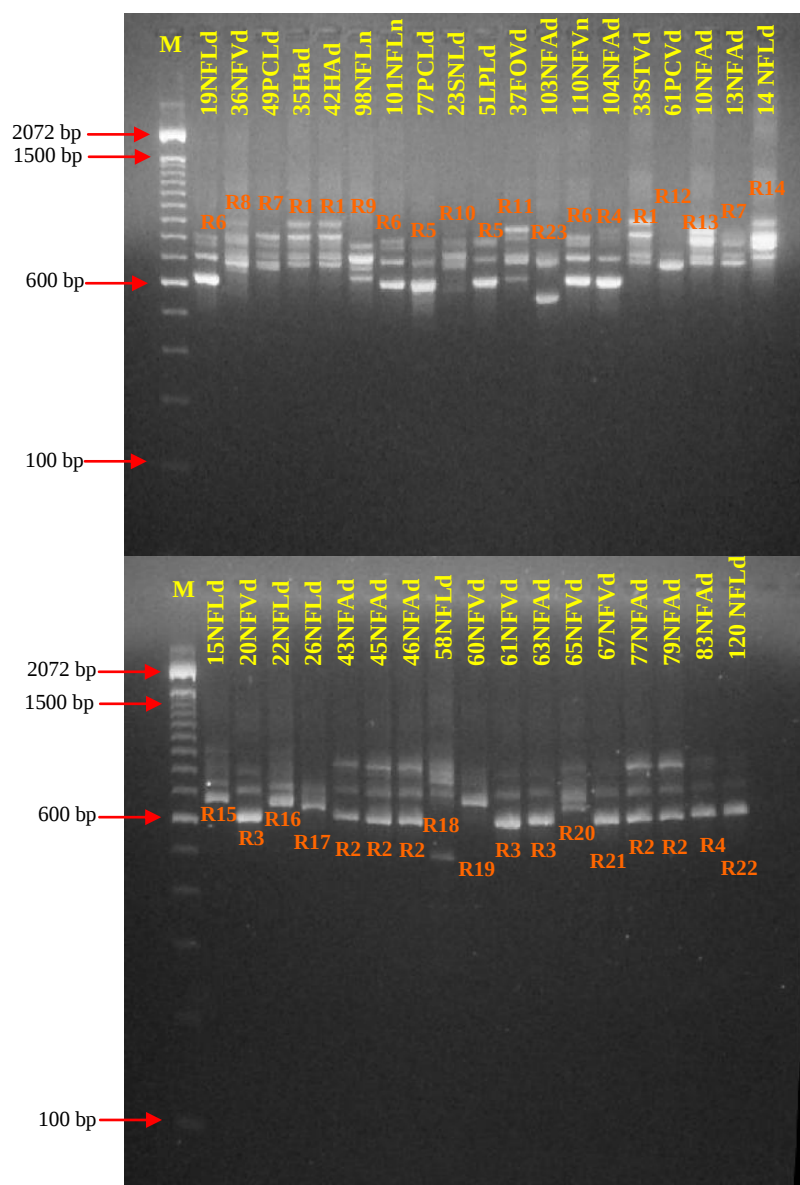


Figura 3: Géis de agarose 2% representativos da Ribotipagem-PCR das amostras positivas para o gene *mecA*.

Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). A letra R indica ribotipo. Na descrição dos isolados, o número indica o número do isolado, as duas primeiras letras indicam o tipo de amostra, a terceira letra indica o setor hospitalar de origem e a última letra indica o período da coleta. Tipos de amostras: LP= Líquido peritonial; PC=Ponta de cateter; SN= Swab nasal de profissional de paciente; ST= Secreção traqueal; H=Sangue; FO=Ferida operatória; NF=Swab nasal de profissional de saúde. Setor de origem: A=Clínicas Cirúrgicas; L= Nefrologia/Hemodiálise; V=UTI. Período de Coleta: d= diurno (7:00-19:00h) e n=noturno (19:00-7:00h).

6. CONCLUSÕES

- *S. aureus* foi o micro-organismo isolado com maior frequência dentre as amostras de pacientes;
- Os técnicos de enfermagem representaram a classe profissional mais acometida por MRS;
- Os indivíduos de menor idade e de menor tempo de profissão foram os mais colonizados por MRS;
- Entre os pacientes, existe maior ocorrência de isolados MRS naqueles internados na hemodiálise/nefrologia;
- Os profissionais das clínicas cirúrgicas foram os mais colonizados por MRS;
- Existem isolados resistentes à vancomicina distribuídos em amostras de colonização;
- Existem vários clones circulantes nos setores estudados do hospital, portanto várias fontes de contaminação;
- Diante do aspecto epidemiológico de MRS observado, o monitoramento da flora microbiana dos funcionários não se faz necessária.

7.PERSPECTIVAS

- Identificar os tipos de *SCCmec* dos isolados *mecA* positivos;
- Identificar os clones dentre os isolados MSSA;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRICH, W.C.; HARBARTH, S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infect Dis*, v. 8, p. 289-301, 2008.

ARAJ, G.F.; TALHOUK, R.S.; SIMAAN, C.J.; MAASAD, M.J. Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 11, p. 47-52, 1999.

BEN-DAVID, D.; MERMEL, L.A., PARENTEAU, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. *Am J Infect Control*, v. 36, n. 2, p. 93-97, 2008.

BENICIO, C.G.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. Isolamento e contagem de *Staphylococcus sp* na saliva de acadêmicos de Medicina. *Braz J Infect Dis*, v. 7, n. 1, p. 91, 2003.

BERGER-BÄCHI, B. Factors affecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 6, p. 13-21, 1995.

BERGER-BACHI, B.; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*, v. 178, n. 3, p. 165-171, 2002.

BHATTACHARYA, D.; CARLETON, H.; TSAI, C.J.; BARON, E.J.; PERDREAU-REMY, F. Differences in clinical and molecular characteristics of skin and soft tissue methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates between two hospitals in Northern California. *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 1798-1803, 2007.

BORER, A.; GILAD, J.; YAGUPSKY, P.; PELED, N.; PORAT, N.; TREFLER, R.; SHPRECHER-LEVY, H.; RIESENBERG, K.; SHIPMAN, M.; SCHLAEFFER, F. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in institutionalized adults with developmental disabilities. *Emerging Infect Dis*, v. 8, p. 966-970, 2002.

BURNHAM, C.A.D.; WEBER, C.J.; DUNNE JR, W.M. Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 48, n. 3, p. 949–951, 2010.

CASSETARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacilin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.

CAVALCANTI, S.M.M.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. *The Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CAVASSINI, M.; WENGER, A.; JATON, K.; BLANC, D.S.; BILLE, J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide látex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 1591-1594, 1999.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CHENG, V.C.C.; LI, I.W.S.; WU, A.K.L.; TANG, B.S.F.; NG, K.H.L.; TO, K.K.W.; TSE, H.; QUE, T.L.; HO, P.L.; YUEN, K.Y. Effect of antibiotics on the bacterial load of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation in anterior nares. *J Hosp Infect*, v. 70, p. 27-34, 2008.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA:CLSI, 2006.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, document M100-S17. Wayne, PA, USA:CLSI, 2007.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S20. Wayne, PA, USA:CLSI, 2010

COELLO, R.; GLYNN, J.R.; GASPAR, C.; PICAZO, J.J.; FERERES, J. Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA. *J Hosp Infect*, v. 37, n. 1, p. 39-46, 1997.

COIA, J.E.; DUCKWORTH, G.J.; EDWARDS, D.I.; FARRINGTON, M.; FRY, C.; HUMPHREYS, H.; MALLAGHAN, C.; TUCKER, D.R. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect*, v. 63, p. 1-44, 2006.

CONCEIÇÃO, T.; TAVARES, A.; MIRAGAIA, M.; HYDE, K.; AIRES-DE-SOUSA, M.; DE LENCASTRE, M. Prevalence and clonality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Atlantic Azores islands: predominance of SCCmec types IV, V and VI. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 29, n. 5, p. 543–550, 2010.

CORBELLA, X.; DOMINGUEZ, M.A., PUJOL, M., AYATS, J., SENDRA, M., PALLARES, R., ARIZA, J., GUDIOL, F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 16, n. 5, p. 351-357, 1997.

CORDEIRO, R.P. Estudo de perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA de Hospital Universitário de Recife-Perananbuco. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPE. Recife, 2004.

CUNY, C.; CLAUS, H.; WITTE, W. Discrimination of *S. aureus* by PCR for r-RNA gene spacer size polymorphism and comparison to SmaI macrorestriction patterns. *Zentralbl Bakteriol*, v. 83, p. 466-476, 1996.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMINGER, B.; WITTE, W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e24360, 2011.

DAS, I.; O'CONNELL, N.; LAMBERT, P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. *J Hosp Infect*, v. 65, p. 117-123, 2007.

DATTA, F.; ERB, T.; HEININGER, U.; GERVAIX, A.; SCHAAD, U.B.; BERGER, C.; VAUDAUX, B.; AEBI, C.; HITZLER, M.; KIND, C.; GNEHM, H.E.; FREI, R. A Multicenter cross-sectional study on the prevalence and risk factors for nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in patients admitted to children's hospitals Switzerland. *Clin Infect Dis*, v. 47, p. 923-926, 2008.

DATTA, P.; GULATI, N.; SINGLA, N.; RANI VASDEVA, H.; BALA, K.; CHANDER, J.; GUPTA, V. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. *J Med Microbiol*, v. 60, n. 11, p. 1613-1616, 2011.

DAUM, R.S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K.; JAMKLANG, M.; BOYLE-VAVRA, S. Novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*, v. 186, p. 1344-1347, 2002.

DAUM, R.S. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, v. 357, n. 4, p. 380-390, 2007.

DE PAULIS, A. N.; PREDARI, S.C.; CHAZARRETA, C.D.; SANTOIANNI, J.E. Five-Test Simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 3, p. 1219-1224, 2003.

DE SOUSA, M. A.; CRISÓSTOMO, M. I.; SANCHES, I. S.; WU, J. S.; FUZHONG, J.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 159-163, 2003.

DEURENBERG, R.H.; NIEUWENMHUIS, R.F.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; STASSEN, F.R.; VAN TIEL, F.H.; STOBBERINGH, E.E.; VINK, C. The prevalence of the

Staphylococcus aureus *tst* gene among community- and hospital- acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. *FEMS Microbiol. Lett*, v. 245, p. 185-189, 2005.

DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Gen Evol*, v. 8, p. 747-763, 2008

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; KUGLER, K.C.; BEACH, M.L.; SADER, H.S. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America. SENTRY Participants Group. *Int J Antim Agents*, v. 13, p. 257-271, 2000.

DICKINSON, T.M; ARCHER, G.L. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 44, n. 6, p. 1616-1623, 2000.

DUARTE, C.O.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 2155-2161, 2002.

EVEILLARD, M.; MARTIN, Y.; HIDRI, N.; BOUSSOUGANT, Y.; JOLY-GUILLOU, M.L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 25, p. 114-120, 2004.

EVEILLARD, M.; DE LASSENCE, A.; LANCIEN, E.; BARNAUD, G.; RICARD, J.D.; JOLY-GUILLOU, M.L. Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital. *Infect Control Epidemiol*, v. 27, p. 181-184, 2006.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 7687-7692, 2002.

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P. H.; CASIN, I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 2766-2771, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-negative Staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacilin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentration of oxacilin. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 8, p. 3609-3614, 2003.

FLOCK, J.I.; HIENZ, S.A., HEIMDAHL, A., SCHENNINGST, T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, v. 64, n. 5, p. 1876-1878, 1996.

FORSMAN, P.; TIISALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology*, v. 143, p. 3491-3500, 1997.

FRANCOIS, P.; PITTET, D.; BENTO, M.; PEPEY, B.; VAUDAUX, P.; LEW, D.; SCHRENZEL, J. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 254-260, 2003.

FREITAS, M.F.L.; LUZ, I.S.; SILVEIRA-FILHO, V.M.; JÚNIOR, J.W.P.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A.; SENA, M.J.; ALMEIDA, A.M.P.; BALBINO, V.Q.; LEAL-BALBINO, T.C. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. *Pesq Vet Bras*, v. 28, n. 12, p. 617-621, 2008.

FRIDKIN, S.K.; HAGEMAN, J.C.; MORRISON, M.; SANZA, L.T.; COMO-SABETTI, K.; JERNIGAN, J. A.; HARRIMAN, K.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; FARLEY, M. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in three communities. *N Engl J Med*, v. 352, n. 14, p. 1436-1444, 2005.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis*, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHO, H.; WECKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62, n. 4, p. 1371-1414, 1998.

GORDON, R.; LOWY, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*, v. 46, p. 350-359, 2008.

GRAHAM, P.L.; LIN, S.X.; LARSON, E.L.; MOELLERING, R.C. U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med*, v. 144, p. 318-325, 2006.

GUILARDE, A.O.; TURCHI, M.D.; MARTELLI C.M.T.; PRIMO, M.G.B. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in Brazilian teaching hospitals. *J Hosp Infect*, v. 63, n. 3, p. 330-336, 2006.

HACKBARTH, C.J.; KOCAGOZ, T.; KOCAGOZ, S.; CHAMBERS, H. F. Point mutation in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 103-106, 1995.

HAAMANN, F.; DULON, M.; NIENHAUS, A. MRSA as an occupational disease: a case series. *Int Arch Occup Environ Health*, v. 84, p. 259-266, 2011.

HENZE, U.; SIDOW, T.; WECKE, J.; LABISCHINSKI, H.; BERGER-BACHI, B.; Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, v. 175, n. 6, p. 1612-1620, 1993.

HESHIKI, Z.; QUESADA, R.M.B.; HESHIKI, R.E.; JOAQUIM, D.M.; BRANDÃO, L.G. Nasal bacteriological flora: a study among medical residents of Londrina University Hospital-Parana State-Brazil. *Semina: Ciências biológicas e da saúde*, v. 23, p. 3-10, 2002.

HIGUCHI , W.; TAKANO,T.; TENG, L.J.; YAMAMOTO, T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. *Bioch Bioph Res Comm*, v. 377, n. 3, p. 752-756, 2008.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet*, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, 1997.

HIRAMATSU, K.; ITO, T.; HANAKI, H. Mechanisms of methicillin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Ballière Clin Infect Dis*, v. 5, p. 221-242, 1999.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiol*, v. 9, p. 486-493, 2001

HIRAMATSU, K.; WATANABE, S.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; BABA, T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, v. 22, n. 1, p. 5-8, 2004.

HISATA, K.; KUWAHARA-ARI, K.; YAMANOTO, M.; ITO, T.; NAKATOMI, Y.; CUI, L.; BABA, T.; TERASAWA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; YAMASHIRO, Y.; HIRAMATSU, K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 7, p. 3364-3372, 2005.

HOLEKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINASKOVA, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med*, v. 9, p. 179-182, 2002.

HOWDEN, B.P.; DAVIES, J.K.; JOHNSON, P.D.R.; STINEAR, T.P.; GRAYSON, M.L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin- intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

HULETSKY, A.; LEBEL, P.; PICARD, F.J.; BERNIER, M.; GAGNON, M.; BOUCHER, N.; BERGERON, M.G. Identification of methicillin-resistant *S. aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. *Clin Infect Dis*, v. 40, n. 7, p. 976-981, 2005.

ITO, T.; HIRAMATSU, K. Acquisition of methicilin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*, v. 39, p. 526-533, 1998.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, p. 1449-1458, 1999.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMITO, K.; TIENSASITON, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 5, p. 1323-1336, 2001.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*, v. 6, p. 41-52, 2003.

ITO, T.; MA, X. X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 7, p. 2637-2651, 2004.

KAPUR, V.; SISCHO, W.M.; GREER, R.S.; WHITTAM, T.S.; MUSSER, J.M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 2, p. 376-380, 1995.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, 2000.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA* carrying low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KATAYAMA, Y.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; MA, X.X.; UI-MIZUTANI, Y.; KOBAYASHI, Y.; HIRAMATSU, K. Identification in methicillin susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, v. 185, n. 9, p. 2711-2722, 2003.

KIM, J. Understanding the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol New*, v. 31, n. 3, p. 17-23, 2009.

KLUYTMANS, J.; BELKUM, A.V.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.

KLUYTMANS, J.; STRUELENS, M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ*, v. 12, n. 1, p. 338-364, 2009.

KOHNER, P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D.; COCKERIL, F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacilin(methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus spp*. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 9, p. 2952-2961, 1999.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J.; HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 51, n. 1, p. 264-274, 2007.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; JR, W.C.W. *Diagnóstico microbiológico*. Texto e Atlas colorido. 5^a ed. MEDSI. Rio de Janeiro p. 551-579, 2001.

KOSTMAN, J. R.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J.; STULL, T.L. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 2084-2087, 1992.

KOSTMAN, J.R.; ALDEN, M.B.; MAIR, M.; EDLIND, T.D.; LIPUMAAND, J.J.; STULL, T.L. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J Infect Dis*, v. 171, p. 204-208, 1995.

KUINT, J.; BARZILAI, A.; REGEV-YOCHAY, G.; RUBISTEIN, E.; KELLER, N.; MAAYAN-METZGER, A. Comparison of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia to other staphylococcal species in a neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr*, v. 166, n. 4, p. 319-325, 2007.

LAMARO-CARDOSO, J.; CASTANHEIRA, M.; OLIVEIRA, R.; SILVA, S.; PIGNATARI, A.; MENDES, R.; PIMENTA, F.; ANDRADE, A. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Children in Brazil. *Diag Microbiol Infect Dis*, v. 57, p. 467-470, 2007.

LAMARO-CARDOSO, J.; DE LENCASTRE, H.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F.C.; OLIVEIRA, L.S.C.; OLIVEIRA, R.M.; NOUER, S.S.; AIRES-DE-SOUSA, M.; MILHEIRIÇO, C.; ANDRADE, A.L.S. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Infants Attending Day Care Centers in Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 47, n. 12, p. 3991–3997, 2009.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol*, v. 67, p. 127-141, 1999.

LIVERMORE, D.M., MUSHTAQ, S., JAMES, D., POTZ, N., WALKER, R.A., CHARLETT, A., WARBURTON, F., JOHNSON, A.P., WARNER, M., HENWOOD, C.J. In vitro activity of piperacilin/tazobactam and other broad-spectrum antibiotics against bacteria from hospitalized patients in the British Isles. *Int J Antimicrob Agents*, v. 22, p. 14-27, 2003.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, v. 111, p. 1265-1275, 2003.

LUCET, J.C.; CHEVRET, S.; DURAND-ZALESKI, I.; CHASTANG, C.; REGNIER, B. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: of a result multicenter study. *Arch Intern Med*, v. 163, p. 181-188, 2003.

LYON, B.R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev*, v. 51, p. 88-134, 1987.

MA, X.X.; ITO, T.; TIENSASITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S.; HIRAMATSU, K. A novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 46, n. 4, p. 1147-1152, 2002.

MACK, D.; SABOTTKE, A.; DOBINSKY, S.; ROHDE, H.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 1, p. 178-183, 2002.

MARANAN, M.C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. *Infect Dis Clin N Am*, v. 11, p. 813-849, 1997.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P.H.; OULLETTE, M.; BERGERON, M.G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 2, p. 231-238, 2000.

MCDUGAL, L.K.; THORNSBERRY, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol*, v. 23, n. 5, p. 832-839, 1986.

MELLES, D. C.; GORKINK, R. F.; BOELEN, H.A.; SNIJDERS, S.V., PEETERS J. K.; MOORHOUSE, M.J.; VAN DER SPEK, P. J.; VAN LEEUWEN, W.B.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H.A.; VAN BELKUM, A. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, v. 114, p. 1732-1740, 2004.

MELO, M.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA, R.L.; COELHO, L.R.; SOUZA, R.R.; GOBBI, C.N.; ROZENBAUM, R.; SOLARI, C.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *J Hosp Infect*, v. 58, n. 4, p. 276-285, 2004.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MIMICA, M.J.; BEREZIN, E.N.; CARVALHO, R.L.B.; MIMICA, I.M.; MIMICA, L.M.J.; SAFADI, M.A.P.; SCHNEIDER, E.; CAIAFFA-FILHO, H.H. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: Is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? *Braz. J. Infect.Dis*, v. 43, n. 6, p. 399-406. 2007.

MIRANDA, O.P.; SILVA-CARVALHO, M.C.; RIBEIRO, A.; PORTELA, F.; CORDEIRO, R.P.; CAETANO, N.; VIDAL, C.F.L.; FIGUEIREDO, A.M.S. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect*, v. 13, p. 1165–1172, 2007.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of Methicillin-Resistant Strains of Staphylococci by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, 1991.

NAIMI, T.S.; LEDELL, K. H.; COMO-SABETTI, K.; BORCHARDT, S.M.; BOXRUD, D. J.; ETIENNE, J.; JOHNSON, S. K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R.N.; LYNFIELD, R. Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*, v. 290, p. 2976-2984, 2003.

NUNES, A.P.F.; SCHUENCK, R.P.; BASTOS, C.C.R.; MAGNANINI, M.M.F.; LONG, J.B.; IORIO, N.L.P.; SANTOS, K.R.N. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. *The Braz J Infec Dis*, v. 11, n. 3, p. 345-350, 2007.

O'BRIEN, F.G.; PEARMAN, J.W.; GRACEY, M.; RILEY, T.V.; GRUBB, W.B. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 2858–2862, 1999.

OKUMA, K.; IWAKAWA, K.; TURNIDGE, J.D.; GRUBB, W.B.; BELL, J.M.; O'BRIEN, F.G.; COOMBS, G.W.; PEARMAN, J.W.; TENOVER, F.C.; KAPI, M.; TIENSASITORN, C.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Dissemination of New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 4289-4294, 2002.

OLIVEIRA, D.; SANCHES, I.S.; TAMAYO, M.; RIBEIRO, G.; COSTA, D.; DE LENCASTRE, H. Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the largest Portuguese teaching hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the 'Iberian' and the 'Brazilian' clones of MRSA. *Clin Microbiol Infect*, v. 4, n. 7, p. 373-384, 1998.

OLIVEIRA, G.A.; FARIA, J.B.; LEVY, C.E.; MAMIZUKA, E.M. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *J Infect Dis*. 5:163-70, 2001a.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist*, v. 7, p. 349-361, 2001b.

OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY, C.E.; GOMES, M.S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control and Hosp Epidemiol*, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001c.

OLIVEIRA, A.M.; RAMOS, M.C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz J Med and Biol Res*, v. 35, p. 175-180, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, *SCCmec* type VI. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, n. 10, p. 3457–3459, 2006.

PEREZ, L.R.R; D´AZEVEDO, P.A. Evaluation of the accuracy of various phenotypic tests to detect oxacilin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis*, v. 12, n. 3, p. 210-212, 2008.

PETINAKI, E, ARVANITI, A, DIMITRACOPOULOS G, SPILIOPOULOU I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother*, v. 47, n. 3, p. 297-304, 2001a.

PETINAKI, E.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene. *Microb Drug Resist*, v. 7, n. 3, p. 297-300.2001b.

REISCHL, U.; LINDE, H.J.; METZ, M.; LEPPMEIER, B.; LEHN, N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using Real-Time Fluorescence PCR. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 2429-2433, 2000.

RIBAS, R.M.; GONTIJO-FILHO, P.P.; DARINI, A.L.C. Conventional versus molecular tests(multiplex PCR and PCR *mecA* gene) for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol*, v. 34, n. 1, p. 35-37, 2003.

RIDENOUR, R.A.; WONG, E.S.; CALL, M.A.; CLIMO, M.W. Duration of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients in the intensive care unit: implications for intervention. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 27, p. 271-278, 2006.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; ZURITA, J.; LABARCA, J.; LUNA, C.M.; SALLES, M.J.C.; GOTUZZO, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis*, v. 14, p. 560–566, 2010.

ROBINSON, D.A.; ENRIGHT, M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 12, p. 3926-3934, 2003.

ROZENBAUM, R.; SAMPAIO, M.G.; BATISTA, G.S.; GARIBALDI, A.M.; TERRA, G.M.F.; SOUZA, M.J.; VIEIRA, E.N.; SILVA-CARVALHO, M.C.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Braz J Med Biol Res*, v. 42, n. 8, p. 756-760, 2009.

RUBIN, R.J.; HARRINGTON, C.A.; POON, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J.A.; MOIDUDDIN, A. Economic impact of *Staphylococcus aureus* in New York city hospitals. *Emerging Infect Dis*, v. 5, p. 9-17, 1999.

RYFFEL, C.; TESCH, W.; BIRCH-MACHIN, I.; REYNOLDS, P.E.; BARBERIS-MAINO, L.; KAYSER, F.H.; BERGER-BACHI, B. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene*, v. 94, p. 137-138, 1990.

SABAT, A.; MALACHOWA, N.; MIEDZOBRODZKI, J.; HRYNIEWICZ, W. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 10, p. 3804–3807, 2006.

SAIMAN, L.; CRONQUIST, A.; WU, F.; ZHOU, J.; RUBENSTEIN, D.; EISNER, W.; KREISWIRTH, B.N.; DELLA-LATTA, P. An outbreak of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 24, p. 317-321, 2003.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.S.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, H.B. Colonização por *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA) e seus fatores associados, em pacientes clínicos admitidos no hospital das clínicas de Porto Alegre. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia/UFRS. Porto Alegre, 2009.

SANTOS, H.B.; MACHADO, D.P.; CAMEY, S.A.; KUCHENBECKER, R.S.; BARTH, A.L.; WAGNER, M.B. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 328-334, 2010.

SCHITO, G.C. The importance of development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, n. 1, p. 3-8, 2006.

SECCHI, C.; ANTUNES, A.L.S.; PEREZ, L.R.R.; CANTARELLI, V.V.; D'AZEVEDO, P.A. Identification and detection of methicillin resistance in non-*epidermidis* coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis*, v. 12, n. 4, p. 316-320, 2008.

SHARIATI, L.; VALIDI, M.; TABATABAIEFAR, M.A.; KARIMI, A.; NAFISI, M.R. Comparison of Real-Time PCR with disk diffusion, agar screen and E-test methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*, v. 61, p. 520–524, 2010.

SHINEFIELD, H.R.; RUFF, N.L. Staphylococcal infections: a historical perspective. *Infect Clin Dis North Am*, v. 23, p. 1-15, 2009.

SHOPSIN, B., KREISWIRTH, B.N. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, v. 7, p. 323-326, 2001.

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

SIEGEL, J.D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control*, v. 35, p. 165-193, 2007.

SIERADZKI, K.; ROBERTS, R.B.; SERUR, D.; HARGRAVE, J.; TOMASZ, A. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 1, p. 39-44, 1999.

SILVA, A.M.; CARVALHO, M.J.; CANINI, S.R.M.S.; CRUZ, E.D.A.; SIMÕES, C.L.A.P.; GIR, E. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: knowledge and factors related to the nursing team's adherence to preventive measures. *Rev Latino Am Enferm*, v. 18, n. 3, p. 50-56, 2010a.

SILVA, E.C.B.F.; MACIEL, M. A.V.; MELO, F.L.; ANTAS, M.G.C.; RABELO, M.A.; BEZERRA NETO, A.M. *Staphylococcus aureus*: Aspectos biológicos e patogênicos. *An Fac Med*, v. 52, p. 168-172, 2007.

SILVA, E.C.B.F.; ANTAS, M.G.C.; BEZERRA NETO, A.M.; RABELO, M.A.; MELO, F.L.; MACIEL, M.A.V. Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* in health care workers at a University Hospital of Recife-PE. *The Braz J Infect Dis*, v. 12, n. 6, p. 504-508, 2008.

SILVA, E.C.B.F.; MACIEL, M.A.V.; MELO, F.L.; LOPES, A.C.S; ACA, I.S. Epidemiological surveillance and susceptibility of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a reference hospital: preliminary assessment. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 69, n. 1, p. 126-130, 2010b.

SILVA, E.C.B.F.; SAMICO, T.M.; CARDOSO, R.R.; RABELO, M.A.; BEZERRA NETO, A.M.; MELO, F.L.; LOPES, A.C.S.; ACA, I.S.; MACIEL, M.A.V. Colonização pelo

Staphylococcus aureus em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. *Rev Esc Enferm USP*, v. 46, n. 1, p. 132-137, 2012.

SILVA, H.A.; ABDALLAH, V.O.S.; CARNEIRO, L.C.; FILHO, P.P.G. Infection and colonization by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. *The Braz J Infect Dis*, v. 7, n. 6, p. 381-386, 2003.

SILVA-CARVALHO, M.C.; TEIXEIRA, L.A.; FERREIRA, F.A.; RIBEIRO, A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. Comparison of different methods for detecting methicillin resistance in MRSA isolates belonging to international lineages commonly isolated in the American continent. *Microbiol Immunol*, v. 53, n. 2, p. 117-122, 2009.

SINGH, K.; GAVIN, P.J.; VESCIO, T.; THOMSON JR, R.B.JR.; DEDDISH, R.B.; FISHER, A.; NOSKIN, G.A.; PETERSON, L.R. Microbiologic surveillance using nasal cultures alone is sufficient for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in neonates. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 2755-2757, 2003.

SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; COELHO, S.M.O.; CUNHA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; MIRANDA, A.N.; SOUZA, M.M.S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus spp.* coagulase negativos isolados de amostras animais e humanas. *Cien Rural*, v. 38, n. 5, p. 1346-1350, 2008.

SOUSA-JUNIOR, F.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERNANDES, M.J.B.C.; VIEIRA, M.F.P.; PELLEGRINO, F.L.P.C.; FIGUEIREDO, A.M.S.; MELO, M.C.N.; MILAN, E.P. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. *Braz J Med and Biol Res*, v. 42, p. 877-881, 2009.

SOUSA JÚNIOR, F.C.; NÉRI, G.S.; SILVA, A.K.; ARAÚJO, B.P.R.C.; GUERRA, M.J.P.D.; FERNANDES, M.J.B.C.; MILAN, E.P.; MELO, M.C.N. Evaluation of different methods for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a University Hospital located in the Northeast of Brazil. *Braz J Microbiol*, v. 41, p. 316-320, 2010.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J.F.; HIRAMATSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 37, n. 6, p. 1219-1226, 1993.

SWENSON, J.M.; LONSWAY, D.; MCALLISTER, S.; THOMPSON, A.; JEVITT, L.; ZHU, W.; PATEL, J.B. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing boderline oxacillin MICs. *Diag Microbiol Infect Dis*, v. 38, n. 5, p. 1346-1350, 2007.

TAKANO, T.; HIGUCHI, W.; OTSUKA, T.; BARANOVICH,T.; ENANY,S.; ISOBE, K.S.H.; DOHMAE, S.; OZAKI,K.; TAKANO, M.; IWAO, Y.; SHIBUYA, M.; OKUBO, T.; YABE, S.; SHI, D.; REVA, I.; TENG, L.J.; YAMAMOTO, T. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 837-845, 2007.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEIXEIRA, L.A.; RESENDE, C.A.; ORMONDE, L.R.; ROSENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A.M.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 9, p. 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HÉBERT, G.A.; HILL, B.; HOLLIS, R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 32, n. 2, p. 407-415, 1994.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletroforesis: criteria for bacterial strains typing. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; JONES, R.N.; SWENSON, J.M. Methods for improved detection of oxacilin resistance in coagulase-negative Staphylococci: results of multicenter Study. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 12, p. 4051-4058, 1999.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; DE LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; MCDOUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 33, p. 1869-1874, 1989.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8ª Ed. Artmed. Porto Alegre. p. 321-322; 422-449.2005.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3ª Ed. Atheneu. São Paulo. p. 119-156.2002.

TRINDADE, P.D.A.; PACHECO, R.L.; COSTA, S.F.; ROSSI, F.; BARONE, A.A.; MAMIZUKA, E.M.; LEVIN, A.S. Prevalence of SCCmec Type IV in nosocomial bloodstream isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 3435-3437, 2005.

TVERDEK, F.P.; CRANK, C.W.; SEGRETI, J. Antibiotic Therapy of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Critical Care. *Crit Care Clin*, v. 24, p. 249-260, 2008.

ÜNAL, S.; HOSKINS, J.; FLOKOWITSCH, J.E.; WU, C.Y.E.; PRESTON, D.A.; SKATRUD, P.L. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 1685-1691, 1992.

VELASCO, D. Evaluation of different methods for detecting methicillin(oxacilin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, v. 55, p. 379-382, 2005.

VELAZQUEZ-MEZA, M.E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Publica de México*, v. 47, p. 381-387, 2005.

VIVONI, A.M.; DIEP, B.A.; MAGALHÃES, A.C.G.; SANTOS, K.R.N.; RILEY, L.W.; SENSABAUGH, G.F.; MOREIRA, B.M. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 1686–1691, 2006.

VONBERG, R.P.; STAMM-BALDERJAHN, S.; HANSEN, S.; ZUSCHNEID, I.; RUDEN, H.; BEHNKE, M.; GASTMEIER, P. How often do asymptomatic healthcare workers cause methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks? A systematic evaluation. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 27, p. 1123-1127, 2006.

WENZEL, R.P.; REAGAN, D.R.; BERTINO, J.S.; BARON, E.J.; ARIAS, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *Am J Infect Dis*, v. 26, n. 2, p. 102-110, 1998.

WERTHEIM, H. F.; VOS, M. C.; BOELEN, H.A.; VOS,A.; VANDENBROUKE-GRAULS, C.M.; MEESTER, M.H.; KLUYTMANS, J.A.; VAN KEULEN, P.H.; VERBRUGH, H.A. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *J Hosp Infect*, v. 56, p. 321-325, 2004.

WERTHEIM, H. F.; MELLES, D.C.; VOS, M. C.; LEEUWEN, W.V.; BELKUM, A.V.; VERBRUGH, H.A.; NOUWEN, J.L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus* infections. *Lancet Infect Dis*, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WIELDERS, C.L.; VRIENS, M.R.; BRISSE, S.; DE GRAAF-MILTENBURG, L.A.; TROELSTRA, A.; FLEER, A.; SCHMITZ, F.J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet* , v. 357, p. 1674–1675, 2001.

WISPLINGHOFF, H.; ROSATO, A.E.; ENRIGHT, M.C.; NOTO, M.; CRAIG, W.; ARCHER, G.L. Related clones containing *SCCmec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 11, p. 3574-3579, 2003.

YOSHIDA, R.; KUWAHARA-ARAI, K.; BABA, T.; CUI, L.; RICHARDSON, J.F.; HIRAMATSU, K. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob. Chemother*, v. 51, p. 247-255, 2003.

ZHANG, K.; MCCLURE, J.A.; ELSAYED, S.; CONLY, J.M. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 2, p. 531–540, 2009.

ZONG, Z.; PENG, C.; LU, X. Diversity of *SCCmec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *Plos One*, v. 6, n. 5, p. e20191, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PROFISSIONAL DE SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa Caracterização fenotípico-molecular de *Staphylococcus spp.* multirresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Coordenadora Principal do Projeto: Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE. CEP: 50670-901.

Assistente de Coordenação do Projeto: Marcelle Aquino Rabelo

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE. CEP: 50670-901. .

Você está sendo convidado a participar voluntariamente desta pesquisa sobre a análise epidemiológica, de susceptibilidade antimicrobiana e genética de *Staphylococcus spp.* de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Serão coletadas amostras da sua cavidade nasal, com o objetivo de verificar a presença ou não da bactéria *Staphylococcus spp.* multi-droga resistente. Também será feito um questionário com perguntas a respeito da sua atividade no hospital, com o objetivo obter dados que apontem características relevantes para pesquisas relacionadas a presença do *Staphylococcus spp.* no ambiente hospitalar.

As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação pessoal, exceto aos responsáveis pelo estudo, e não haverá divulgação das mencionadas informações. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados em eventos científicos ou publicados em periódicos científicos nacionais ou internacionais, mas é assegurado o sigilo sobre sua participação, de forma que os seus dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A participação neste estudo não trará nenhum tipo de prejuízo, principalmente em relação à atividade exercida na instituição de trabalho e em nenhuma outra. A sua participação não é obrigatória e você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo. O risco ao qual você está sendo submetido é o constrangimento durante a abordagem para o preenchimento do questionário e coleta das amostras, que poderá causar-lhe apenas leve coceira devido ao uso do swab, e caso seja necessário você será encaminhado à assistência médico-psicológica. . O presente estudo não trará benefícios diretos, mas para instituição na qual você desenvolve suas atividades profissionais e para os pacientes aos quais presta assistência, sim, melhorando as ações de controle de infecção hospitalar.

O pesquisador está autorizado a realizar novas pesquisas com as amostras que foram coletadas, caso sejam encontrados outros micro-organismos de interesse médico, visando, desta forma, contribuir para a obtenção de dados para a pesquisa em saúde no Brasil.

Declaro ter compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente do meu direito, de conhecer os resultados do estudo e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu dou o meu consentimento sem que para isso eu tenha sido forçado ou obrigado.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento.

Assinatura do profissional participante: _____

1ª testemunha: _____

2ª testemunha: _____

Responsável pelo estudo: _____

Recife, ____ de _____ de 2011.

Comitê de Ética em Pesquisa:

Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel.: 2126 8588

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA PROFISSIONAL DE SAÚDE

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA			
Data da entrevista:		Número do questionário:	
INFORMAÇÕES PESSOAIS			
NOME:			
SEXO:	(1) Masc (2) Fem		
IDADE:			
INFORMAÇÕES PROFISSIONAIS			
ATIVIDADE PROFISSIONAL:			
(1) Técnico Enfermagem (2) Enfermeiro (3) Médico (4) Outros			
SETOR QUE TRABALHA:			
(1) UTI (2) Clínicas Cirúrgicas (3) Hemodiálise/Nefrologia			
SETORES QUE TRABALHOU:			
TEMPO DE PROFISSÃO:			
TEMPO DE EXERCÍCIO DO SETOR:			
UTILIZAÇÃO DE EPIs DURANTE AS ATIVIDADES: (JALECO, LUVAS E MÁSCARAS)		(1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca	
EPIs UTILIZADOS COM MAIOR FREQUÊNCIA:		(1) Todos (Jaleco, luva e máscara) (2) Nenhum (3) Jaleco (4) Luva (5) Máscara (6) Luva + jaleco (7) Luva + máscara (8) Máscara + jaleco	
QUANTIDADE DE HOSPITAIS QUE TRABALHA:			
QUAIS:			
INFORMAÇÕES DA COLETA			
RESULTADO DA AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA:		(1) Negativo (2) Positivo	
INFORMAÇÕES SOBRE O MICRO-ORGANISMO			
PROVA DA CATALASE:		(1) Positivo (2) Negativo	
PROVA DA COAGULASE:		(1) Positivo (2) Negativo	
PROVA DA DNASE:		(1) Positivo (2) Negativo	
CRESCIMENTO EM ÁGAR MANITOL SALGADO:		(1) Positivo (2) Negativo	
OBSERVAÇÕES*:			

*informações a respeito dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, testes fenotípicos e de biologia molecular.

APÊNDICE C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PACIENTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa Caracterização fenotípico-molecular de *Staphylococcus spp.* multirresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco..

Coordenadora Principal do Projeto: Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE. CEP: 50670-901. .

Assistente de Coordenação do Projeto: Marcelle Aquino Rabelo

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE. CEP: 50670-901.

Você está sendo convidado a participar voluntariamente desta pesquisa sobre a análise epidemiológica e genética de *Staphylococcus spp.* de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Serão coletadas amostras biológicas, que podem ser da ponta de cateter, drenos, sangue, abscesso, ferida operatória e/ou secreções diversas, dependendo do sítio que apresentar características de infecção, com o objetivo de saber se existe a presença ou não da bactéria *Staphylococcus spp.* multi-droga resistente. Também será feito um questionário com perguntas a respeito da sua internação no hospital, com o objetivo obter dados que apontem características relevantes para pesquisas relacionadas à presença do *Staphylococcus spp.* no ambiente hospitalar

Você não será submetido a nenhum tipo de risco capaz de prejudicar a sua integridade física e/ou mental. O risco ao qual você está sendo submetido é o constrangimento durante a abordagem para o preenchimento do questionário e coleta das amostras, que poderá causar-lhe apenas leve coceira devido ao uso do swab, ou no caso de amostra de sangue, leve desconforto no contato com a seringa de coleta, que será mínimo devido a experiência do profissional responsável pela mesma. Caso seja necessário você será encaminhado à assistência médico-psicológica. . O presente estudo poderá não trazer benefícios diretos, além da identificação da bactéria multirresistente, mas para instituição na qual você se encontra hospitalizado e para os pacientes aos quais presta assistência, sim, melhorando as ações de controle de infecção hospitalar.

As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação pessoal, exceto aos responsáveis pelo estudo, e não haverá divulgação das mencionadas informações. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados em eventos científicos ou publicados em periódicos científicos nacionais ou internacionais, mas é assegurado o sigilo sobre sua participação, de forma que os seus dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A sua participação não é obrigatória e você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo.

O pesquisador está autorizado a realizar novas pesquisas com as amostras que foram coletadas, caso sejam encontrados outros micro-organismos de interesse médico, visando, desta forma, contribuir para a obtenção de dados para a pesquisa em saúde no Brasil.

Declaro ter compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente do meu direito, de conhecer os resultados do estudo e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu dou o meu consentimento sem que para isso eu tenha sido forçado ou obrigado.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento.

Recife, ____ de _____ de 2011.

Assinatura do paciente: _____

1ª testemunha: _____

2ª testemunha: _____

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

Assinatura do responsável pelo estudo _____

Comitê de Ética em Pesquisa:

Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel.: 2126 8588

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA PACIENTE

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA			
Data da entrevista:		Número do questionário:	
INFORMAÇÕES PESSOAIS			
NOME:			
SEXO:	(1) Masc (2) Fem		
IDADE:			
INFORMAÇÕES DO PACIENTE			
SETOR DE ORIGEM:	(1) UTIs (2) Clínicas Cirúrgicas (3) Hemodiálise/Nefrologia		
INFORMAÇÕES DA COLETA			
RESULTADO DA AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA:		(1) Negativo (2) Positivo	
SÍTIO ANATÔMICO DA COLETA:		(1) Ponta de cateter (2) Drenos (3) sangue (4) abscesso (5) ferida operatória (6) secreções diversas	
INFORMAÇÕES SOBRE O MICRO-ORGANISMO			
PROVA DA CATALASE:	(1) Positivo (2) Negativo		
PROVA DA COAGULASE:	(1) Positivo (2) Negativo		
PROVA DA DNASE:	(1) Positivo (2) Negativo		
CRESCIMENTO EM ÁGAR MANITOL SALGADO:		(1) Positivo (2) Negativo	
OBSERVAÇÕES*:			

*informações a respeito dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, testes fenotípicos e de biologia molecular.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 111/2011 - CEP/CCS

Recife, 07 de abril de 2011

Registro do SISNEP FR – 396521

CAAE – 0490.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 009/11

Título: **Caracterização fenotípico-molecular de Staphylococcus spp. Multiresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.**

Pesquisador Responsável: Marcelle Aquino Rabelo

Senhor (a) Pesquisador (a):

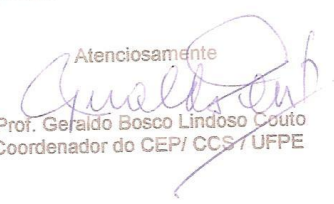
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 06 de abril de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Departamento de Medicina Tropical - CCS/UFPE

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588;
e-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA ULAB-HC

Da: Profª. Maria Amélia Vieira Maciel
Departamento Medicina Tropical
Para: Dr. Juliano Sálvio Cazuzu
Chefe da Unidade Laboratório-ULAB
Hospital das Clínicas - UFPE

Recife, 26 de abril de 2011

Prezado Dr. Juliano Cazuzu

Venho através desta carta, solicitar a VSa a aquisição de amostras bacterianas procedentes de Setor da Bacteriologia do ULAB do Hospital das Clínicas, que serão adquiridas e transportadas pela Mestranda Marcelle Aquino Rabelo para o projeto "CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus spp.* MULTIRRESISTENTES DE AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO", o mesmo com aprovação da Comissão ética.

Profª. Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Amélia Vieira Maciel
Deptª Medicina Tropical
Prof. Associado - SIAPE 1222

Estou de acordo
e transportarei
as amostras bacterianas.

UFPE - HOSPITAL DAS CLÍNICAS
Juliano Sálvio Cazuzu
Chefe Unidade de Laboratório - ULAB
CRM - 6255