



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

---

**MARCELLE PAIANO CARDOSO**

**AQUISIÇÃO NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR RECÉM-NASCIDOS  
SAUDÁVEIS**

---

**MARINGÁ**

**2007**

**MARCELLE PAIANO CARDOSO**

**AQUISIÇÃO NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR RECÉM-  
NASCIDOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. João Bedendo

**MARINGÁ**

**2007**

**MARCELLE PAIANO CARDOSO**

**AQUISIÇÃO NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR RECÉM-  
NASCIDOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

**Aprovado em:**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Bedendo (Orientador)  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sheila de Araújo Teles (Titular)  
Universidade Federal de Goiânia

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Jacinta Sanchez Pelayo (Titular)  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Bronharo Tognim (Suplente)  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Denise Mai (Suplente)  
Universidade Estadual de Maringá

*Dedico este trabalho*

*Ao meu marido, que não mediu esforços para que este trabalho pudesse ser concluído. Sem  
você nada disto seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou meu caminho e me conduziu até aqui. Muito obrigada Senhor!

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, e por acreditarem que pudesse vencer mais esta etapa em minha vida.

Aos meus irmãos: irmão é aquela pessoa que o tempo não apaga, que a doença não separa, que a maldade não destrói e que a saudade aproxima. A vocês o meu grande abraço.

Ao meu marido, que compreendeu minha ausência nos momentos difíceis e que esteve comigo em todas as etapas para concretizar o meu sonho.

A Prof.<sup>a</sup> Magda, uma pessoa maravilhosa, meu exemplo, minha amiga, minha eterna admiração.

A enfermeira Tanimária e psicóloga Ana Carolina, profissionais brilhantes e amigas inesquecíveis que fizeram parte da minha trajetória.

A todos os profissionais do Centro Cirúrgico do Hospital Universitário de Maringá, em especial a enfermeira Célia, sem o esforço de vocês, esse trabalho não seria possível.

A Prof.<sup>a</sup> Maria Cristina e prof. Celso Cardoso, quanta sabedoria, quanto aprendizado, quanta amizade. Aprendi com vocês que tudo é possível, que é preciso seguir, é preciso acreditar. Obrigada por me receberem de braços abertos.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básica, pelo acolhimento, colaboração e carinho com que me receberam e pelo conhecimento compartilhado.

As amigas, Cecília, Karina e Giselle, sem vocês não teria a menor graça o dia-a-dia no laboratório. Em especial agradeço a Cecília, companheira, inteligente, com um coração imenso e sempre disposta a ajudar.

A Prof.<sup>a</sup> Vera e Rosilene, por me acolher quando precisei.

Ao prof. João Bedendo, meu orientador, que esteve presente nos momentos de angústias e momentos de alegrias, e apesar dos obstáculos encontrados no caminho, conseguimos chegar até aqui. Obrigada!

Também agradeço a todos os colegas que participaram direta ou indiretamente deste momento.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá.

A Fundação Araucária, por subsidiar-me com bolsa de estudos.

*O Senhor é a minha rocha, a minha cidadela, o meu libertador; o meu Deus, o meu rochedo em que me refúgio; o meu escudo, a força da minha salvação, o meu baluarte (Salmos 18:2).*

# AQUISIÇÃO NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR RECÉM-NASCIDOS SAUDÁVEIS

## RESUMO

Um percentual significativo da população adulta é portadora de *Staphylococcus aureus* nos vestíbulos nasais, pele e mucosas sendo que em recém-nascidos esta porcentagem é expressivamente maior, podendo atingir 100% nas crianças até o quarto dia de vida. Neste estudo verificou-se a aquisição nasal de *Staphylococcus aureus*, entre 50 recém-nascidos saudáveis, e a ocorrência do microrganismo na aréola/mamilos de suas respectivas mães. Foram realizadas três coletas dos vestíbulos nasais e uma coleta dos mamilos/aréola. O material biológico foi semeado em ágar manitol salgado e posteriormente mantido em caldo de soja tripticaseína por 24 horas para nova semeadura. As amostras de *Staphylococcus aureus* foram avaliadas quanto à susceptibilidade a oxacilina, através da técnica de determinação da concentração inibitória mínima, sendo que aquelas oxacilina-resistentes foram avaliadas quanto a susceptibilidade aos demais antimicrobianos pelo sistema de disco difusão e quanto a presença do gene *mecA*. Dentre as parturientes, 56% (28/50) tiveram cultura positiva para *Staphylococcus aureus* e entre os recém-nascidos 90% (45/50) proporcionaram o isolamento do microrganismo. Em relação ao binômio mãe-filho, 50% (25/50) dos pares carregavam o microrganismo. Aproximadamente 59% (43/73) das amostras foram isoladas a partir da semeadura direta havendo um incremento de 51% quando o swab foi mantido em meio de enriquecimento. A resistência a oxacilina, através do teste de concentração inibitória mínima, foi detectada em 7 das 73 amostras sendo que em apenas 6 confirmou-se o resultado pelo método de disco difusão. A sensibilidade ao linezolid, vancomicina, mupirocina e telitromicina foi de 100% e a resistência a cefoxitina foi de 100%. Em relação à detecção do gene *mecA*, 85,7% (6) das amostras resistentes a oxacilina carregavam o gene *mecA*.

**Palavras chaves:** Recém-nascido. *Staphylococcus aureus*. Resistência.



## ACQUISITION OF NASAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS by HEALTHY NEWBORNS

### ABSTRACT

A significant percentile of the adult population bears *Staphylococcus aureus* in the nasal vestibules, skin and mucous membranes, but in newborns that percentage is outstanding, once it reaches 100% in the four-day-old newborns. In the present study both, the acquisition of nasal *Staphylococcus aureus* among 50 healthy newborns and the occurrence of the microorganism in their respective mothers' mammal areola/nipples was investigated. Three samples from the nasal vestibules and one from the areola/nipples were collected. The biological material was sown into salty mannitol agar and later it was maintained into trypticasein soy broth for 24 hours for proceeding a new sowing. *Staphylococcus aureus* samples were assayed to observe the susceptibility to oxacillin, by using a technique known as 'determination of minimum inhibitory concentration'. Thus the resistant oxacillin were analyzed in relation to both, susceptibility to other antimicrobial - by using the disk diffusion method - and the presence of *mecA* gene. Results showed that, among

parturients, 56% (28/50) showed positive culture for *Staphylococcus aureus*, whereas among the newborns, 90% (45/50) provided the isolation of the microorganism. In relation to the binomial mother-son, 50% (25/50) of the pairs carried the microorganism. Approximately 59% (43/73) of the samples were isolated from direct sowing, having an increment of 51% when the swab was maintained in enrichment medium. The resistance to oxacillin, through the test of minimum inhibitory concentration, was detected in 7 out of the 73 samples, and, when using the disk diffusion method, the result was confirmed in 6 of them. The sensibility to linezolid, vancomycin, mupirocin and telithromycin was of 100%, whereas the resistance to cefoxitin was of 100%. In relation to the detection of *mecA* gene, results showed that 85.7% (6) of the resistant samples to oxacillin carried *that gene*.

**Keywords:** Newborn. *Staphylococcus aureus*. Resistance.

# ADQUISICIÓN NASAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POR RECIÉN NACIDOS SALUDABLES

## RESUMEN

Un porcentual significativo de la población adulta es portadora de *Staphylococcus aureus* en los vestíbulos nasales, piel y mucosas siendo que en recién nacidos este porcentaje es expresivamente mayor, pudiendo alcanzar el 100% en los niños hasta el cuarto día de vida. En este estudio se verificó la adquisición nasal de *Staphylococcus aureus*, entre 50 recién nacidos saludables, y la ocurrencia del microorganismo en areola/pezones de sus respectivas madres. Fueron realizadas tres recolecciones de los vestíbulos nasales y una recolección de los pezones/areola. El material biológico fue sembrado en agar manitol salado y posteriormente mantenido en caldo de soja tripticaseína por 24 horas para nueva sembradura. Las muestras de *Staphylococcus aureus* fueron evaluadas en cuanto a la susceptibilidad a la oxacilina, a través de la técnica de determinación de la concentración mínima inhibitoria, siendo que aquellas oxacilinas resistentes fueron evaluadas en cuanto a la susceptibilidad a los demás antimicrobianos por el método de disco difusión y en cuanto a la presencia del gene *mecA*. De entre las parturientas, el 56% (28/50) tuvo cultura positiva para *Staphylococcus aureus* y entre los recién nacidos el 90% (45/50) proporcionó el aislamiento del microorganismo. Con relación al binomio madre-hijo, el 50% (25/50) de los pares cargaban el microorganismo. Aproximadamente el 59% (43/73) de las muestras fueron aisladas a partir de la sembradura directa habiendo un incremento del 51% cuando el swab fue mantenido en medio de enriquecimiento. La resistencia a la oxacilina, a través del teste de concentración mínima inhibitoria, fue detectada en 7 de las 73 muestras, siendo que en solamente 6 se confirmó el resultado por el método de disco difusión. La sensibilidad a la linezolidina, vancomicina, mupirocina y telitromicina fue de 100% y la resistencia a la cefoxitina fue de 100%. Con relación a la detección del gene *mecA*, el 85,7% (6) de las muestras resistentes a la oxacilina cargaban el gene *mecA*.

**Palabras clave:** Recién nacido. *Staphylococcus aureus*. Resistencia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Relação de carreamento de <i>S. aureus</i> entre parto normal e parto cesárea.....	40
<b>Figura 2</b> - Reação em cadeia de polimerase para determinação do gene <i>mecA</i> em amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de recém-nascidos e mães atendidas num Hospital Universitário do Norte do Paraná de fevereiro a abril de 2007.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados do teste de Determinação da CIM das 07 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas dos vestibulos nasais de recém-nascidos e da aréola/mamilo de mães atendidas no Hospital Universitário do Norte do Paraná de fevereiro a abril de 2007....	41
<b>Tabela 2.</b> Resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana das 7 amostras de <i>S. aureus</i> resistentes a oxacilina aos antimicrobianos usualmente empregados na rotina clínica.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ORSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina

UFC: Unidades formadoras de colônia

RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PBP: Proteína fixadora de penicilina

SCC*mec*: Staphylococcal Chromosomal Cassette

TSB: Caldo de soja tripticaseína

CIM: Concentração inibitória mínima

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

VISA: *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina

VRSA: *S. aureus* resistentes a vancomicina

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

*Fem*: *Factor essential for methicilin resistance*

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

ATCC: American Type Culture Collection

CA-ORSA: ORSA adquirida na comunidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologia e Epidemiologia dos <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolamento e Identificação de <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Resistência Antimicrobiana de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Portador São.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Colonização e/ou Carreamento.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Teste de diluição em ágar.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Estudo Genotípico.....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Reação da polimerase em cadeia (PCR).....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Quantificação de DNA em gel de Agarose.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>População de Estudo.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Critério de Inclusão.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Coleta de Material.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Semeadura/isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Coleta de Material.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Semeadura/isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>33</b>

<b>4.5</b>	<b>Teste para pesquisa da coagulase.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>39</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Teste de disco difusão.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</b>	<b>36</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Extração de DNA.....</b>	<b>36</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Reação de amplificação.....</b>	<b>37</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Eletroforese.....</b>	<b>38</b>
<b>4.8</b>	<b>Comitê de Ética.....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Teste de resistência à oxacilina através do método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de discodifusão.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Detecção do gene <i>MecA</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* permanece como importante agente etiológico nas infecções bacterianas, sendo responsável por mais de 30% dos casos clínicos nas instituições hospitalares (MUNDIM *et al.*, 2003). No homem os principais reservatórios dos *S. aureus* são representados pelos vestíbulos nasais e a orofaringe, mas pode ser encontrado também na área perineal, na pele e, às vezes, no trato gastrointestinal e outras áreas corpóreas (VON EIFF *et al.*, 2001).

Nos hospitais, os reservatórios de *S. aureus* são pacientes colonizados, funcionários e o próprio ambiente (MUNDIM *et al.*, 2003), e a transmissão cruzada tem sido documentada. Biologicamente, tem como característica a capacidade de sobreviver e se multiplicar numa ampla variedade de ambientes, além de dispor de um conjunto de mecanismo de virulência e de grande versatilidade no que se refere a sua patogenicidade. Adicionalmente, distingue-se por sua capacidade de integrar-se à microbiota normal do hospedeiro e estabelecer um estado de portador crônico, numa frequência superior à que determinam infecções (RICARDO, 2004; BOYCE *et al.*, 2003).

Aproximadamente 20 a 70% da população adulta são portadores de *S. aureus* nas fossas nasais, e em recém-nascidos esta porcentagem é expressivamente maior nas primeiras semanas de vida, podendo atingir 100% nas crianças no quarto dia de vida (CIMOLAI, 2003; VON EIFF *et al.*, 2001).

Os portadores nasais, através das mãos, podem contaminar a pele, fato que se evidencia quando observamos *S. aureus* em mãos e fossas nasais, sugerindo uma contaminação a partir das próprias fossas nasais, objetos por eles manuseados ou mesmo uma fonte externa, representada principalmente por indivíduo doente ou portador (RADDI; LEITE; MENDONÇA, 1988).

O papel da transmissão familiar veiculando *S. aureus* resistente a oxacilina (ORSA) para bebês recém-nascidos e prematuros já foi relatado na literatura (MUDER *et al.*, 1991; TVETEN *et al.*, 1991). Em estudos recentes a taxa de portadores de ORSA entre mulheres grávidas variou de 0,8% a 1,3%. O reconhecimento de que as mães podem servir como reservatórios para infecções nosocomiais por ORSA implica uma nova questão em termos de controle de infecção hospitalar (MITÃO; HAMADA; HIRAI, 1995).



Bjorksten et al. (1980) afirmam que, em leite humano coletado recentemente, o conteúdo de bactérias é originado da pele e microbiota dos ductos dos mamilos. Citam ainda que a microbiota do mamilo, antes e depois da amamentação, pode conter, em média de 1,0 a  $7,5 \times 10^2$  UFCs de *S. aureus* por  $\text{cm}^2$ , contra aproximadamente  $2,3 \times 10^3$  UFCs por  $\text{cm}^2$  no antebraço e  $1,0 \times 10^6$  UFCs por  $\text{cm}^2$  na axila das mulheres portadoras desses microrganismos. Welsh e May (1979) registraram a presença de *Staphylococcus spp.* em 24% das amostras de leite fresco de mães sadias.

Estudos relatam a transmissão de ORSA entre pais e filhos (JAFFAR; AL-TAWFIQ, 2006) e entre irmãos (HOLLIS et al., 1995), e confirmam a transmissão vertical desta bactéria através de mães saudáveis, na fase de amamentação, e seus recém-nascidos (KAWADA et al., 2003).

Ao albergar o agente potencialmente infectante, o organismo pode comportar-se de duas maneiras fundamentais: revelando-se como caso declarado ou clínico, ou então como assintomático, caso em que o portador é genericamente conhecido como “portador são ou assintomático”. A condição de portador assintomático ocorre quando no momento do exame o indivíduo encontra-se destituído de sintomatologia, apesar de estar colonizado. Assim, portadores assintomáticos podem ser classificados em portadores permanentes ou persistentes (20%), portadores intermitentes ou transitórios (60%) e não portadores (20%) (KLUITMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997).

A detecção do portador nasal de *S. aureus* é importante para se compreender a epidemiologia da infecção, particularmente quando se suspeita da existência de colonização ou carreamento de cepas multirresistentes que podem aumentar a morbimortalidade.

A identificação de *S. aureus* se dá através de provas morfotintoriais e bioquímicas, sendo a detecção da produção de coagulase uma prova definitiva que identifica esta espécie bacteriana (KONEMAM et al., 2001). *S. aureus* são microrganismos pouco fastidiosos, crescem facilmente em meios de cultivos simples contendo cloreto de sódio, manitol e sangue de coelho, mas o período decorrido entre a obtenção de material biológico e a semeadura em laboratório pode ser um fator importante na determinação da frequência de isolamento. Alguns meios de transporte enriquecidos, utilizados para manutenção da viabilidade das cepas, têm sido empregados para se incrementar a frequência de isolamento.

Os mecanismos de patogenicidade dos *S. aureus*, como causadores de infecção nosocomial, têm mudado com o passar dos anos, devido, entre outros, a fatores como a pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 1999), hospitalização prolongada, (BRADLEY et al., 1991), idade (LOWY, 1998; MELISH;

CAMPBELL, 1998) e uso de imunodepressores (CHAMBERS, 2001). Estudos têm demonstrado que a associação entre ocorrência de *S. aureus* multirresistentes e deficiência ou imaturidade do sistema imunológico pode determinar aumento da morbimortalidade entre recém-nascidos (STOLL et al., 2002; HEALY et al., 2004).

No Brasil, os *S. aureus* têm se mostrado multirresistentes aos grupos de drogas usualmente empregadas na rotina clínica, como as penicilinas e cefalosporinas (PACCEZ, 1997; TODA, 2003). A resistência a oxacilina é um marcador de resistência para outras drogas, e têm sido encontrados altos percentuais de cepas resistentes a este antimicrobiano entre indivíduos hospitalizados (TAVARES, 2000; MARANAN et al., 1997).

O *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) preconiza um elenco de drogas que devem ser avaliadas para determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *S. aureus* procedentes de casos clínicos de infecção. Esta padronização não preconiza a incorporação rotineira de testes para se avaliar a resistência a Mupirocina - um agente antiestafilocócico de uso tópico que inibe a síntese de proteínas e RNA - para o tratamento de infecções estafilocócicas. De acordo com alguns estudos, (TACCONELLI et al., 2003; TRAUTMANN et al., 2008), o uso tópico deste antimicrobiano pode ser uma ferramenta eficaz na redução da incidência de infecções subseqüentes.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para estudo epidemiológico de *S. aureus*, e atualmente tem sido amplo o emprego de metodologias moleculares, entre as quais tem se destacado a “técnica de reação em cadeia da polimerase” (PCR). Através desta técnica é possível amplificar regiões específicas da molécula de DNA que identifica marcadores genéticos (BENDIT; GIGLIO; NETO, 1999).

Técnicas de tipagem moleculares têm sido usadas para determinar a freqüência epidemiológica de ORSA e melhorar a compreensão das relações evolutivas entre os clones de ORSA (CORSO et al., 1998; LENCASTRE et al., 1996; LENCASTRE et al., 1999; SANCHES et al., 1998). Uma das conclusões que emergem destes estudos salienta que uma caracterização completa destas linhagens não só requer identificação genética das bactérias, mas também identificação dos tipos estruturais do elemento *mec* que conferem resistência à oxacilina determinada pelo gene *mecA* (SOUSA et al., 1996; SANCHES et al., 1998; STEWART et al., 1994).

A resistência à oxacilina é mediada por PBP2a, uma proteína fixadora de penicilina (PBP), que se liga a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (HARTMAN; TOMASZ, 1984; UTSUI; YOKOTA, 1985). A PBP2a é codificada pelo *mecA* que se situa em um *SCCmec*, que é transferível entre espécies de estafilococos (ITO et al., 2001).

*Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* (SCCmec) é um elemento genético móvel, composto do complexo *MEC*, que codifica a resistência à oxacilina, sendo classificado em quatro classes e definindo dessa forma quatro tipos de elementos de SCCmec. Recentemente o quinto elemento foi achado no cromossomo de um *S. aureus* resistente a oxacilina adquirido na comunidade, sendo isolado na Austrália. O SCCmec tipo V é um elemento pequeno (28 kb) e não leva nenhum gene de resistência antimicrobiana além do *mecA*. O elemento compartilhou o mesmo local de integração cromossômica com os quatro tipos existentes de SCCmec (ITO et al., 2004).

Com o aparecimento de cepas de *S. aureus* resistente à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo oxacilina e glicopeptídeos, estudos foram projetados com o objetivo de detectar fatores de risco para carreamento de ORSA (VANDENBERGH; VERBRUGH, 1999; VANDENBERGH; YEZERMAN; BELKUN, 1999). Um maior risco de colonização e infecção subsequente por ORSA é observado em pacientes imunossuprimidos expostos à terapia antibiótica, diabéticos insulín dependentes, pacientes em uso de cateteres, pessoas em contato com pacientes colonizados ou infectados por esta bactéria (HADDADIN; FAPPIANO; LIPSETT, 2002), pacientes acima de 60 anos de idade (HADDADIN; FAPPIANO; LIPSETT, 2002; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006), pacientes com dermatoses apresentando ruptura de pele (HADDADIN; FAPPIANO, LIPSETT, 2002; LUCET et al., 2003; SCANVC et al., 2001), pacientes com história de hospitalização (LUCET et al., 2003; SCANVC et al., 2001) ou cirurgia (HADDADIN; FAPPIANO; LIPSETT, 2002; LUCET et al., 2003), pacientes transferidos depois de hospitalização prolongada e portadores de doenças crônicas (LUCET et al., 2003).

Considerando o exposto, propusemos o presente estudo, que tem como objetivo verificar a ocorrência deste microrganismo nos vestíbulos nasais de recém-nascidos saudáveis e na mucosa da aréola/mamilo das respectivas mães. Tal objetivo é justificado por envolver o estudo de um microrganismo que ocupa um lugar de destaque na microbiota de indivíduos saudáveis, principalmente durante o processo de amamentação, onde há a possibilidade de transmissão deste microrganismo, que é capaz de gerar infecções, além da sua grande versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do estudo é identificar a ocorrência de aquisição nasal de *S. aureus* entre recém-nascidos saudáveis e verificar a frequência de mães que carregam esta espécie bacteriana na aréola e mamilos.

### 2.2 Objetivos específicos

Constituem-se como objetivos específicos:

- verificar a frequência de carregamento nasal de *S. aureus* entre recém-nascidos saudáveis nas primeiras 72 horas de internação hospitalar e após 15 dias do nascimento;
- identificar a frequência de carregamento de *S. aureus* na pele (mamilo/aréola) de mães submetidas a parto normal ou cirúrgico;
- avaliar a frequência de isolamento de *S. aureus* através da semeadura direta de material biológico e após 24 horas de incubação em meio de cultivo de caldo de soja tripticaseína (TSB);
- identificar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *S. aureus* isoladas;
- verificar a *sensibilidade a oxacilina*, através de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *S. aureus* isoladas;
- determinar, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença do gene *mecA* nas amostras de *S. aureus* identificadas como resistentes a oxacilina pelo método de diluição em ágar e discodifusão.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biologia e epidemiologia dos *Staphylococcus*

Estafilococos (gr. *staphyle*, uva) são cocos gram-positivos, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalasepositivos. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, e nisso se diferenciam dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose. Caracterizam-se por apresentar células esféricas de cerca de 1µm de diâmetro para os estafilococos patogênicos, maiores e desiguais em se tratando de estafilococos ou micrococos saprófitas (ADELBERG; JAWETZ; MELNICK, 1995).

As culturas jovens de certas cepas podem exibir cápsula, porém, de modo geral, consideram-se os estafilococos como acapsulados, que são gram-positivos nas culturas recentes, mas tendem a perder essa propriedade nas culturas velhas (ADELBERG; JAWETZ; MELNICK, 1995).

Crescem bem nos meios de culturas mais comuns, como caldo simples ou ágar simples, pH 7, à temperatura ótima de 37°C. Produzem colônias de cerca de 1-3mm de diâmetro, convexas, da superfície livre e bordos circulares, opacas e brilhantes. Deixando-se as placas um ou dois dias à temperatura ambiente, as culturas de estafilococos patogênicos recém-isolados geralmente desenvolvem um pigmento amarelo, ao passo que os estafilococos saprófitas formam colônias brancas (ADELBERG; JAWETZ; MELNICK, 1995).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 30 espécies, sendo algumas freqüentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. As principais espécies de estafilococos encontrados em seres humanos são os *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*.

*S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, tendo um baixo potencial patogênico, assim como *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da região periuretral do homem, da mulher e da pele. Ao contrário, o *S. aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e também nas fossas nasais (ADELBERG; JAWETZ; MELNICK, 1995).

A transmissão do *S. aureus* ocorre por contato direto e por contato indireto. As infecções estafilocócicas superficiais podem ser consideradas graves se acometerem recém-

nascidos, pacientes cirúrgicos e portadores de doenças debilitantes. Esta é uma das razões pelas quais as infecções estafilocócicas severas são mais frequentemente adquiridas em hospitais (ADELBERG; JAWETZ; MELNICK, 1995).

Indivíduos de todas as faixas etárias podem ser acometidos, com ênfase para as crianças com idade inferior a cinco anos ou em determinadas situações predisponentes, como diabetes *mellitus*, insuficiência renal crônica, insuficiência hepática crônica, desnutrição grave, fibrose cística, usuários de droga endovenosa e pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (MELISH; CAMPBELL, 1998).

As instituições hospitalares são importantes focos de disseminação de infecções, e os pacientes internados estão expostos a riscos de contrair infecção. A internação hospitalar contribuiu para a disseminação de infecções, pois, após o período de internação a microbiota habitual da faringe e do intestino é gradativamente substituída pela microbiota prevalente nas instituições (TAVARES, 2000).

### **3.2 Isolamento e Identificação de *S. aureus***

Vários estudos demonstram que o uso de cultura em caldo aumenta a sensibilidade de detecção de ORSA de espécimes clínicos. Estudo realizado por Cookson, Webster e Phylips (1987) demonstrou que a adição de *S. aureus* em caldo para um placa de meio sólido aumentou o rendimento destas bactérias em 10,7%. Sautter, Brown e Mattman (1988) relatam que a adição de cultura em caldo aumentou o rendimento de espécies clínicas de 20% a 60% .

Hartstein e Mulligan (1996), utilizando métodos de plaqueamento direto em placas, mostraram uma diminuição na taxa de carreamento para ORSA. Em uma comparação de meios em placa e caldo contendo estafilococos, observa-se o isolamento de quase três vezes mais, quando utilizado o caldo de crescimento bacteriano.

Com o avanço da tecnologia, os métodos de identificação de microrganismos tem-se tornado cada vez mais rápidos e acurados. A tecnologia tem sido ampliada para abordar um maior número de diagnósticos de infecções por diferentes microrganismos permitindo a identificação de paciente infectado e adoção de medidas apropriadas de prevenção e controle.

Segundo Konemam et al. (2001), durante um período de pouco mais de 100 anos foram desenvolvidos sistemas de classificação de microrganismos em um esquema que se baseia na morfologia, filogenia, fisiologia, bioquímica e genética.

Os métodos de detecção/identificação de *S. aureus* atualmente disponíveis permitem ao laboratório identificar a espécie, de modo rápido e preciso. O crescimento de microrganismos em meios seletivos ou diferenciais, as características coloniais, a morfologia celular em esfregaços corados são avaliados e empregados para fins de isolamento e identificação das espécies microbianas e, quando utilizados apropriadamente e em conjunto com cuidadosa investigação epidemiológica, fornecem uma abordagem efetiva na pesquisa e controle da distribuição de microrganismos nas instituições da saúde (KONEMAM et al., 2001).

### **3.3 Resistência antimicrobiana de *S. aureus***

Na era pré-antibiótica, *S. aureus* ficou conhecido como um patógeno de difícil tratamento. As infecções estafilocócicas são caracterizadas pela inflamação intensa de tecidos locais, com tendência a que a área infectada se torne encapsulada, conduzindo à formação dos abscessos (TAVARES, 2000).

Desde os primeiros relatos de *S. aureus* oxacilinarresistente (ORSA) como um dos principais patógenos nosocomiais dos anos sessenta, a incidência de infecções causadas por este microrganismo continua aumentando (GOLD; MOELLERING, 1996). Infecções causadas por ORSA aumentam o tempo de hospitalização, sendo responsáveis por aumentos nos custos médicos, além de aumentar o índice de mortalidade (CARBON, 1999; MARANAN et al., 1997; COSGROVE et al., 2003; ENGEMANN et al., 2003).

Uma característica da resistência a oxacilina é sua natureza heterogênica. A expressão de resistência varia conforme o meio de cultura, a concentração de sal e antibiótico do meio e a temperatura de incubação; aproximadamente 1% de ORSA expressa resistência em qualquer momento (CHAMBERS, 1997). Destarte, meios seletivos são necessários para aumentar a recuperação de ORSA (LALLY; EDERER; WOOLFREY, 1985; WINSTANLEY; EGGINGTON; SPENCER, 1993).

Pacientes assintomáticos carreadores de microrganismos multirresistentes, como ORSA, constituem-se como base para muitos programas de controle de infecção. Para

detecção da colonização precoce, o serviço de controle de infecção pode desenvolver ações preventivas, normalmente na forma de colocar os pacientes colonizados em precauções de barreira apropriadas (JERNIGAN et al., 1995; JERNIGAN et al., 1996).

Em hospitais, onde *S. aureus* resistentes à oxacilina são prevalentes, aproximadamente 30 a 60% dos pacientes colonizados desenvolvem uma infecção (OLIVEIRA et al., 1999). O uso constante de antimicrobianos pode dar origem à seleção de microrganismos já previamente existentes em uma população bacteriana (TAVARES, 2000).

A resistência antimicrobiana é reflexo dos hábitos de uso dos antimicrobianos em cada comunidade, sendo assim importante conhecer o padrão de resistência em cada grupo de pacientes atendidos em cada hospital (AUBRY-DAMON; COURVALIN, 1999). Monitorar a evolução da resistência do *S. aureus* é muito importante, não só por esta ser uma das bactérias mais freqüentes na prática médica, mas também por sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos com diferentes matizes de expressão fenotípica a um mesmo antibiótico (TODA, 2003).

Até a introdução dos antibióticos, durante os anos 40 do século passado, a mortalidade por infecção invasiva por *S. aureus* de era cerca de 90%. A introdução da penicilina G melhorou muito o prognóstico destes quadros, mas quase imediatamente houve o surgimento de cepas resistentes. Esta resistência se devia à aquisição de plasmídeos que codificavam a produção de betalactamases. A ação das betalactamases inibia a ação da penicilina. Aqui no Brasil, nos últimos anos, foram documentadas taxas de resistência à penicilina de 85% a 100% (TODA, 2003; PACCEZ, 1997).

A resistência intrínseca dos estafilococos à meticilina/oxacilina resulta de suas PBPs, presentes na parede celular, as quais passam a ser expressas por um gene cromossômico adquirido, *mecA*, que codifica as PBP2' ou 2a, cuja afinidade com os antibióticos betalactâmicos é muito baixa. Esta resistência dos estafilococos aos antibióticos betalactâmicos pode depender de alguns fatores ambientais, como pH, temperatura e osmolaridade (RYFFEL; KAYSER; BERGER-BACHI, 1992).

Alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais ou genes *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), ajudam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos betalactâmicos. Foram identificados muitos desses genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL et al., 1995).

O gene *femA* é essencial para a expressão da resistência dos ORSA e parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos.



Os genes *femA* e *mecA* têm sido detectados em cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina/oxacilina por meio de técnicas moleculares, como a reação de polimerase em cadeia (PCR). Esta técnica apresenta vantagens em relação às outras, pois oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível (OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002).

Em 1996 ocorreu o surgimento de estirpes de *S. aureus* com reduzida sensibilidade a vancomicina (CIM > 8-16mcg/ml), inicialmente no Japão, a seguir nos Estados Unidos da América e agora em outros países. Estes estafilococos, chamados inicialmente de VISA e GISA (siglas em inglês indicando *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina ou aos glicopeptídeos), são denominados simplesmente de VRSA (*S. aureus* Vancomicina Resistente) e encontram-se em expansão em hospitais japoneses (HIRAMATSU et al., 1997).

Estafilococos com resistência aos glicopeptídeos foram recentemente encontrados no Brasil. Registrou-se o isolamento de *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina no Rio de Janeiro, em São Paulo e Porto Alegre, e de estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo (SANTOS, 1997; MAMIZUKA; OLIVEIRA, 2000).

A resistência microbiana é um fenômeno biológico natural, mas se torna um problema significativo de saúde pública ao ser ampliada várias vezes, por abuso e negligência nas ações desenvolvidas, e inclusive por sua subutilização nos países em desenvolvimento. Em todos os casos, o uso inadequado de antibióticos poderosos resultará depois em drogas menos efetivas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

### **3.4 Portador São**

Ao albergar o agente potencialmente infectante, o organismo pode comportar-se de duas maneiras fundamentais: revelando-se como caso declarado ou clínico, com sinais e sintomas da moléstia clinicamente diagnosticáveis, ou então como assintomático, quando o portador é genericamente conhecido como portador são, por encontrar-se destituído de sintomatologia no momento do exame, apesar de estar colonizado (FORATTINI, 1986).

O portador são tem sido considerado a mais silenciosa, porém a mais perigosa fonte de microrganismos responsáveis por infecções, não havendo outra forma de reconhecê-lo que não a adoção de métodos laboratoriais (ANDERSON; ARNSTEIN; LESTER, 1965).

Distinguem-se entre eles os que nunca apresentaram os sintomas da doença (portadores passivos) e aqueles que já os apresentaram no passado ou poderão vir a tê-los no futuro (portadores ativos) (DAVIS et al., 1973; FORATTINI, 1986).

Considerando-se que ambos os tipos albergam o agente infectante em seu organismo, embora se apresentem destituídos de sintomatologia, o que se faz normalmente é usar denominações para distinguir os vários períodos de colonização pelo microrganismo. Assim, eles podem ser classificados em portadores permanentes ou persistentes (20%), quando apresentam capacidade de albergar o agente por longo tempo; portadores intermitentes ou transitórios (60%), quando albergam o agente por períodos variáveis; e não portadores (20%), quando não colonizados anteriormente pelo microrganismo, mesmo com repetidas coletas. A prevalência de carreadores nasais varia de acordo com a população estudada, oscilando entre 14,3% a 52,5%, com uma média de 29,8% em pacientes hospitalizados (KLUITMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997).

### **3.5 Colonização e/ou Carreamento**

A pele ou *cútis* é o manto de revestimento do organismo, e é indispensável à vida, já que isola componentes orgânicos do meio exterior, impede a ação de agentes externos de qualquer natureza, evita perda de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno, dá proteção imunológica, faz termorregulação, propicia a percepção e tem função secretória.

Do ponto de vista da flora microbiana da pele, temos duas populações: a residente e a transitória.

A flora residente é composta pelos microrganismos que vivem e se multiplicam na pele e podem ser viáveis por longo período. Esses microrganismos diferem entre si tanto qualitativa quanto quantitativamente, dependendo do local de alojamento no corpo e da população bacteriana envolvida. As bactérias dessa flora não são facilmente removidas por escovação, entretanto, podem ser inativadas por anti-sépticos. As bactérias mais comumente encontradas são as gram-positivas. Nas mãos, essas e outras bactérias localizam-se em maior quantidade em torno e sob as unhas (BRASIL, 1985).

A maioria dos microrganismos da flora residente é encontrada nas camadas superficiais da pele, porém um percentual de 10 a 20% localiza-se nas fendas das mãos ou no interior dos folículos pilosos, onde os lipídios e o epitélio superficial estratificado podem

dificultar sua remoção. São de baixa virulência e raramente causam infecção; contudo podem ocasionar infecções sistêmicas em pacientes imunodeprimidos e após procedimentos invasivos (BRASIL, 1985).

A flora transitória, como o nome sugere, é passageira, e os microrganismos que a compõem são viáveis por apenas um curto período. Suas bactérias são mais fáceis de remover, pois se encontram na superfície da pele, junto a gorduras e sujidades (BRASIL, 1985).

A colonização do ser humano pelos microrganismos que irão fazer parte da sua microbiota normal tem início no nascimento. Ela não é uniforme no que se relaciona à qualidade e quantidade e se distribui pelas diferentes partes do corpo que estão em contato com o meio externo, principalmente a pele e as mucosas (GILBERT, 1992), podendo, em circunstâncias particulares, produzir a doença (ROUQUARYROL; VERAS, 1994; SOUNIS, 1985).

Os recém-nascidos estão em contato permanente com os estafilococos, sendo as barreiras físicas da pele e mucosas a principal proteção, uma vez que o sistema imune encontra-se ainda em desenvolvimento (LEWIS; WILSON, 2001). Ao nascimento, os recém-nascidos podem ser colonizados, principalmente no coto umbilical, na área perineal, na pele e, às vezes, no trato gastrointestinal. Estima-se que entre 20% e 40% dos adultos são portadores, sendo a área mais freqüentemente colonizada o vestíbulo nasal anterior (VON EIFF et al., 2001).

A partir desta colonização podem ocorrer bacteremias, infecções esporádicas ou epidêmicas, comunitárias ou hospitalares, sendo a sua transmissão veiculada pelo contato interpessoal direto, por meio de objetos contaminados ou pelo ar (LOWY, 1998). Elas podem causar infecções de pele e tecidos moles (impetigo, furúnculo, foliculite, hidradenite, abscesso, celulite, erisipela, linfangite, fascite necrotizante, linfadenite, piomiosite, mastite, onfalite, infecção de ferida cirúrgica), otite, sinusite, abscesso amigdaliano, pneumonia, meningite, bacteremia, sepse, endocardite, pericardite, osteomielite, artrite séptica, abscessos de víscera (fígado, baço, pâncreas, rim) por invasão direta ou outros quadros secundários à produção e liberação de toxinas, como intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada estafilocócica (MELISH; CAMPBELL, 1998; WALDVOGEL, 2000).

Amir, Garland e Lumley (2006), estudando mães saudáveis durante o processo de amamentação, verificaram que a taxa de carregamento nasal de *S. aureus* em seus lactentes era de 56%; e Peacock et al. (2003) constataram uma taxa de 50% durante as primeiras 8

semanas. Crianças mais jovens tendem a apresentar taxas elevadas de colonização, provavelmente devido ao freqüente contato com secreções respiratórias. Em todos os casos, a colonização pode ser uma condição transitória ou persistente, prolongando-se por anos (RICARDO, 2004).

Entre os recém-nascidos colonizados o risco de desenvolver doença varia, sendo menor para os portadores de *S. aureus* sensíveis à oxacilina, com um risco aumentado em 10 vezes para pacientes colonizados por *S. aureus* resistentes (BOYCE et al., 2003; APPERE DE VECCHI et al., 2000).

A infecção por ORSA em recém-nascidos pode apresentar uma variedade de sintomas clínicos e complicações, entre eles: conjuntivite (JERNIGAN et al., 1996), celulite periorbital (LE THOMAS et al., 2001), pneumonia (DAVIES et al., 1987), síndrome da pele escaldada (RAYMOND et al., 1997) e sepse (JERNIGAN et al., 1996).

Entre recém-nascidos, a colonização de ORSA tem sido detectada na orofaringe, narinas, região umbilical, virilha e axilas, podendo servir como um precursor para infecções. Pode ocorrer transmissão cruzada incluindo membros do *staff* hospitalar, familiar, inclusive de mãe para filho (MUDER et al., 1991). Fatores de risco associados com transmissão nosocomial incluem cateteres intravenosos, (CAMPBELL et al., 1998) antimicrobianos tópicos (GRAHAM et al., 1980) e contaminações através da equipe de saúde.

A transmissão de ORSA em meio familiar foi descrita em associação com a colonização crônica das narinas (MITSUDA et al., 1996; HOLLIS et al., 1995), furunculoses crônicas (LE THOMAS et al., 2001), sendo que a transmissão pelo binômio mãe-filho pode acontecer via transplacentária ou por secreções genitais contaminadas (MITSUDA et al., 1996). A transmissão de ORSA para crianças pelo leite materno foi descrita como agente de colonização ou infecção grave somente na presença de mastites ou abscessos no seio (LE THOMAS et al., 2001; RAYMOND et al., 1997; JONES, 2001).

Behari et al. (2004) constataram em seu estudo a transmissão de uma única cepa de ORSA pelo leite materno de uma mãe assintomática para seus dois filhos prematuros, causando colonização e subsequente infecção. A extensão em que a colonização materna contribuiu para a contaminação do leite permanece não confirmada. Fatores de risco potenciais para carreamento de ORSA pela mãe incluíram cesariana anterior, antibióticos pré-natais e gestações múltiplas.

## **3.6 Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana**

### **3.6.1 Método de disco difusão**

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse microrganismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o microrganismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (NCCLS, 2003).

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em muitos laboratórios de microbiologia clínica se utiliza-se rotineiramente o método de discodifusão em ágar para testar os patógenos mais comuns, de crescimento rápido, e determinadas bactérias fastidiosas (NCCLS, 2003).

Os testes de discodifusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, e sem consideração do tamanho do halo eles não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de discodifusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIMs), com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (NCCLS, 2003).

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo causador de um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável com base na identificação do microrganismo e quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (NCCLS, 2003).

### **3.6.2 Teste de diluição em ágar**

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado

isolado bacteriano. Para realizar o teste, preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão-padrão do microrganismo a ser testado. Após incubação de um dia para outro, a 35° C, examinam-se os testes e determina-se a concentração inibitória mínima (CIM). O resultado final é influenciado de maneira significativa pela metodologia, que deve ser cuidadosamente controlada para se obterem resultados reprodutíveis (intra- e interlaboratórios) (NCCLS, 2003).

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo que contribua para um processo infeccioso que justifique quimioterapia antimicrobiana, se sua sensibilidade não pode ser predita de maneira confiável a partir da identificação do microrganismo (NCCLS, 2003). Os testes de sensibilidade são iniciados, com mais frequência, quando se acredita que o microrganismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos mais frequentemente usados. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam as drogas, a alteração do sítio-alvo das drogas e a alteração da absorção ou do efluxo das drogas (NCCLS, 2003). Alguns microrganismos ainda possuem sensibilidade previsível a agentes antimicrobianos, e a terapia empírica é amplamente reconhecida (NCCLS, 2003).

### **3.7 Estudo Genotípico**

#### **3.7.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR)**

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa voltada ao entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Esta técnica é uma das ferramentas mais úteis em biologia molecular, pois permite amplificar milhões de vezes um fragmento específico de DNA. Com esta técnica podemos,

portanto, detectar a presença de uma quantidade mínima de um fragmento específico de DNA (BENDIT; GIGLIO; NETO, 1999).

A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região-alvo (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Senna et al. (1996) relataram que esse método oferece maior eficácia e segurança quando comparado aos métodos tradicionais de identificação bacteriana empregados na rotina laboratorial. Além disso, com a PCR é possível identificar ORSA em 18 horas aproximadamente (LOUIE et al., 2002).

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA-alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95° C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica, de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, produz-se mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência-alvo (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Destarte, esta escala de amplificação permite iniciar com quantidades mínimas de DNA e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a tornam particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer microrganismo vivo (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

### 3.7.2 Quantificação de DNA em gel de agarose

Após finalizar os procedimentos de extração de ácidos nucleicos deve-se verificar a quantidade de DNA obtida, podendo ser realizada por dois métodos: a espectrofotometria ou em gel de agarose, por leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004). O brometo de etídio é um corante que se intercala nas moléculas dos ácidos nucleicos, sendo que a luz ultravioleta (UV) induz sua fluorescência (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

A quantidade observada sob UV é proporcional à massa total de DNA da amostra colocada no poço da eletroforese. Para quantificá-la, faz-se a fotodocumentação e compara-se a fluorescência da amostra àquela de um padrão conhecido (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Os géis de agarose são dissolvidos na presença de tampão apropriado até se obter uma solução clara e transparente. Após a sua fusão em alta temperatura (ou em forno microondas) a solução, ainda quente (50°C), é colocada em um suporte ou molde, geralmente de acrílico. Após ocorrer a solidificação da matriz, cuja densidade é determinada pela concentração da agarose, as amostras podem ser aplicadas (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Quando o campo elétrico é aplicado através do gel, o DNA, que é carregado negativamente em um pH neutro, migra para o ânodo. A taxa de migração é determinada por uma série de parâmetros, dentre os quais podem ser citados: concentração da agarose, peso molecular do DNA, conformação do DNA, voltagem aplicada, direção do campo elétrico, composição do tampão e presença de agentes intercalantes (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de Estudo**

O presente estudo foi desenvolvido em um hospital de ensino público do Estado do Paraná, credenciado junto ao Sistema Único de Saúde (SUS), que tem por objetivo o desenvolvimento de ensino, pesquisa e extensão de serviços à comunidade. Atende à população do Município de Maringá e região, e ainda pacientes vindos de outras cidades dos Estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

O estudo foi desenvolvido no setor de Ginecologia e Obstetrícia, que apresenta uma estrutura física de quatro enfermarias e uma sala de pré-parto, contando com 3 leitos/quarto. O hospital recebe, por ano, aproximadamente 690 nascidos vivos, em média 58,1 ao mês, sendo que 50,80% desses nascimentos são de parto normal e 49,20% são de parto cesáreo.

### **4.2 População de Estudo**

Trata-se de um estudo baseado no método de caso, realizado no período de fevereiro a abril de 2007, onde foram coletadas amostras dos vestíbulos nasais de 50 recém-nascidos, utilizando para análise dos dados o método de proporções e frequências simples.

### **4.3 Critério de Inclusão**

Foram incluídos no estudo todas as parturientes e seus recém-nascidos que não apresentaram nenhum sinal ou sintoma clínico de doença e tiveram alta hospitalar em 48 horas (parto normal) ou 72 horas (parto cesáreo).

Todas as parturientes envolvidas foram esclarecidas a respeito do estudo, e após concordarem em participar dele, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1). Logo após o nascimento, foi aplicado um questionário com as mães, com

as seguintes variáveis: data e hora do nascimento, idade e nome da mãe, nome da criança, número do prontuário, idade gestacional, sexo da criança, parto, escala de Ápgar (que consiste na avaliação de 5 sinais objetivos do recém-nascido no primeiro e no quinto minutos após o nascimento, atribuindo-se a cada um dos sinais uma pontuação de 0 a 2; a escala é utilizada para avaliar as condições dos recém-nascidos), peso ao nascer, estatura ao nascer, data provável da alta, endereço e telefone da parturiente (Anexo 2).

#### **4.4 Coleta de Material**

A obtenção de material biológico da aréola/mamilo das parturientes e dos vestíbulos nasais de seus respectivos recém-nascidos, para isolamento e identificação de *S. aureus*, foi realizada com auxílio de *swabs* estéreis em meio de transporte (Copan Itália S.P.A. Brescia, Italy). O material foi semeado em placas de Petri 90 X 15 mm contendo ágar manitol salgado (Becton Dickinson and Company, BD Diagnostic Systems, USA). A coleta das parturientes foi realizada após o parto, sendo que o período decorrido entre a coleta de material e a semeadura, em nenhum dos casos, ultrapassou 6 horas. Para os recém-nascidos a coleta dos vestíbulos nasais foi realizada após o nascimento e com 48/72 horas antes da alta hospitalar.

Na vigência de resultado negativo para identificação de *S. aureus* nas duas primeiras coletas entre os recém-nascidos, era realizada uma terceira coleta após 15 dias do nascimento, no domicílio. Os recém-nascidos positivos logo na primeira coleta eram excluídos da segunda e terceira coletas. Quando eram positivos na segunda coleta, eram excluídos da terceira coleta; e por fim, quando eram negativos na segunda coleta, era realizada a última coleta no domicílio.

##### **4.4.1 Semeadura/isolamento e identificação de *S. aureus***

O material biológico foi obtido friccionando-se o *swab*, por três vezes, na mucosa da aréola/mamilo e no terço inferior de cada um dos vestíbulos nasais, conforme proposto por Zelante et al., (1982). No Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá o material foi semeado na superfície de placas de Petri 90 x 15mm contendo ágar manitol

salgado e incubado por 72 horas a 37°C. Após a semeadura o *swab* foi mantido em caldo de soja tripticaseína (TSB) adicionado NaCl a 2% e incubado por 24 horas a 37°C. A seguir o material foi semeado na superfície da placas de Petri contendo ágar manitol salgado e incubado a 37°C por mais 72 horas.

Duas colônias suspeitas de pertencer a *S. aureus* foram, a seguir, repicadas para TSB e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C e em seguida novamente plaqueadas em ágar Mueller Hinton (*Becton Dickinson and Company, BD Diagnostic Systems, USA*) para verificação da pureza das colônias.

Colônias puras suspeitas de pertencer a *S. aureus* foram submetidas à *coloração de gram* e prova da produção de coagulase em tubo (TOLEDO, 1989). As colônias que se apresentaram com cocos gram-positivos agrupados em cachos e produtoras de coagulase foram estocadas, em duplicata, em *freezer* a -20°C. Para manutenção das estirpes empregou-se solução de glicerol (ágar/ágar + solução de glicerol a 30%).

#### **4.5 Teste para pesquisa da coagulase**

Para a detecção da produção da coagulase foi empregada a metodologia proposta por Konemam et al., (2001). Colônias suspeitas de pertencer a *S. aureus* foram adicionadas a um tubo contendo plasma de coelho liofilizado (Coagulo-Plasma LB, Laborclin produtos para laboratório Ltda, Pinhais Paraná, Brasil) e incubado a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 4 horas. As leituras foram realizadas após 30 minutos, quatro e 24 horas de incubação. A formação de coágulo foi indicativa de prova positiva para identificação de *S. aureus*. Como controle positivo utilizou-se a amostra ATCC *S. aureus* 25923.

#### **4.6 Suscetibilidade aos Antimicrobianos**

##### **4.6.1 Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A determinação da CIM foi realizada pelo método de agardiluição para oxacilina. As placas de ágar Mueller-Hinton foram preparadas com o número de diluições necessárias para

o antibiótico, sendo a maior diluição duas concentrações acima da resistência e a última diluição a menor concentração da cepa-padrão.

A concentração da solução-estoque foi calculada a partir da maior concentração testada para o antimicrobiano, do volume de ágar Mueller-Hinton utilizado nas placas de Petri e do volume final da solução-estoque. A quantidade em miligramas do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque (mg/mL)}$$
$$\text{Potência do antibiótico}(\mu\text{g/mL})$$

Após o preparo, a solução-estoque foi esterilizada por filtração em membrana Millipore® de 0,22 µm de diâmetro e estocada. A diluição do antimicrobiano foi feita utilizando-se água estéril (tipo Milli Q). A solução-estoque foi a primeira diluição a ser utilizada e, a partir dela foram feitas diluições 1:2 até atingir a menor concentração.

As concentrações testadas abrangeram os cortes descritos nas tabelas do documento M7-A7 do NCCLS, de 8 µg/ml a 0,06 µg/ml. A solução inicial com concentração igual a 8 µg/ml foi obtida a partir de uma solução-estoque com concentração igual a 1600 µg/ml, utilizando-se o diluente adequado (NCCLS, 2003).

Para o preparo dos meios, foi pesado ágar Mueller-Hinton em quantidade suficiente para todas as diluições dos antimicrobianos, segundo especificações do fabricante. Posteriormente esse material foi alíquotado em tubos nas quantidades de 19 ml, sendo esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos e depois resfriados em banho-maria até atingirem a temperatura de aproximadamente 50°C. Em cada tubo foi adicionado 1 ml do antimicrobiano, totalizando um volume de 20 ml, necessário para atingir a espessura de 4-5 ml de meio na placa. O tubo foi homogeneizado. e o ágar, distribuído em placa de Petri.

As placas foram refrigeradas e utilizadas até 48 horas após seu preparo. Para o preparo do inóculo, foi usada uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de MacFarland (1,5 x 10<sup>8</sup>UFC/mL). Foram distribuídos 200 µl de cada suspensão bacteriana em placas de Elisa de 96 poços. Com o auxílio de um aplicador de 28 pinos, inoculamos as amostras inicialmente em placa-controle sem antimicrobiano, para observarmos a viabilidade das amostras, e na seqüência as inoculamos nas demais placas, com concentração crescente do antimicrobiano. No final da série de diluição os isolados foram inoculados em uma placa-controle sem antimicrobiano, para se avaliar a contaminação e o carreamento significativo da

droga durante o procedimento. Após 30 minutos de secagem as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

Utilizou-se como controle de qualidade para este teste a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 43300. A leitura foi realizada e os limites foram comparados com aqueles aceitáveis propostos pelo NCCLS (2003).

#### **4.6.2 Teste de disco difusão**

A realização deste teste foi baseada nas recomendações do NCCLS (2003). Inicialmente preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland, a qual foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton. Os antimicrobianos utilizados foram oxacilina 1µg, cefoxitina 30µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, telitromicina 15µg, tetraciclina 30µg, norfloxacinina 10µg, mupirocina 5µg e linezolid 30µg.

Os discos foram depositados sobre este meio com uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. O controle de qualidade dos discos de antimicrobianos e do meio de cultura foi realizado para cada lote através da cepa *S. aureus* ATCC 25923, e os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na Tabela 2C, M2-A9, do documento do NCCLS (2003).

#### **4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

##### **4.7.1 Extração de DNA**

Os isolados de *S. aureus*, testados pela técnica de “Reação em cadeia da polimerase” (PCR) foram inicialmente semeados em ágar Mueller-Hinton e incubados por 24 a 48 horas à temperatura de 37°C. Uma a duas colônias foram transferidas para tubos de vidro contendo 3 ml de TSB e incubados *overnight* a 37°C. Quinhentos microlitros da suspensão bacteriana foram transferidos para tubos tipo *eppendorf* e a seguir o DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit *Qiagen*, (*Qiaamp Dna minikit*, *Uniscience* do Brasil, São Paulo-SP, Brasil),

segundo as instruções do fabricante. O DNA genômico foi avaliado quanto à sua concentração em gel de eletroforese, tendo-se como parâmetro comparativo o padrão de peso molecular *DNA ladder* 100 bp (Invitrogen Brasil, São Paulo-SP, Brasil).

#### 4.7.2 Reação de amplificação

A reação em cadeia da polimerase para a detecção do gene *mecA* foi realizada conforme a metodologia proposta por Vannuffel *et al.*, (1995) descrita a seguir:

Primer MecA-F 5'TGGCTATCGTGTCAACAATCG 3' foi comprado liofilizado a 37,6 nmoles, para fazermos uma solução-mãe de estocagem de *primer*. Seguindo os seguintes cálculos:

$$\begin{array}{rcl} 37,6 \text{ nmoles} = 37600 \text{ pmoles} & \text{----} & X \\ 200 \text{ pmoles} & \text{----} & 1\text{mL} \end{array}$$

X = 188  $\mu$ L de água Milli Q, tendo assim uma solução de *primer* a 200 pmoles/ $\mu$ L

Como na reação foram utilizados 10 pmoles, fez-se uma diluição da solução-mãe de estoque a 1:20 para colocar no tubo de reação de PCR.

*Primer* MecA-R 5'CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG3' foi comprado liofilizado a 34,8 nmoles para fazermos uma solução-mãe de estocagem de *primer*, efoi diluído o liofilizado seguindo os seguintes cálculos:

$$\begin{array}{rcl} 34,8 \text{ nmoles} = 34800 \text{ pmoles} & \text{----} & X \\ 200 \text{ pmoles} & \text{----} & 1\text{mL} \end{array}$$

X = 174  $\mu$ L de água Milli Q, tendo-se assim uma solução de *primer* a 200 pmoles/ $\mu$ L

Como na reação foram utilizados 10 pmoles, fez-se uma diluição da solução-mãe de estoque a 1:20 para colocar no tubo de reação de PCR.

Os reagentes utilizados para confecção da mistura para a reação, em suas respectivas quantidades foram: 14,1 $\mu$ L de água Milli Q estéril, 2,0 $\mu$ L de tampão (10 mM Tris HCl [pH 8.8]), 0,8 $\mu$ L de cloreto de magnésio (1,5mM), 1,4 $\mu$ L de dNTP (250 $\mu$ M), 0,5 $\mu$ L dos *primers* a

10 pmoles, 1,0 $\mu$ L de DNA (amostra) e 0,2 $\mu$ L de Taq polimerase (2U), para um volume final de 20 $\mu$ L.

As reações foram realizadas em termociclador com a seguinte ciclagem: 95°C por 10 min., 30 ciclos de: 95°C por 30 seg., 52 °C por 30 seg., 72 °C por 1 min., e por fim, 72 °C por 10 min. O amplicom de cada amostra foi de 310 pares de base (pb). Como controle negativo foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923, por serem reconhecidas como sensíveis à oxacilina, e a cepa *S. aureus* ATCC 33591, por ser resistente.

### **4.7.3 Eletroforese**

Os produtos da reação de amplificação foram analisados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular *DNA Ladder 100 bp* (*Invitrogen*, Brasil) foi empregado para se comparar o peso molecular dos fragmentos amplificados, e a visualização dos produtos foi feita sob luz ultravioleta (UV). A corrida eletroforética foi realizada a 100 watts por 40 minutos.

### **4.8 Comitê de Ética**

Antes da coleta nasal dos pacientes incluídos no estudo, seus responsáveis/acompanhantes foram esclarecidos sobre os objetivos do trabalho proposto e a coleta só se realizou mediante sua concordância, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá (Parecer N.º 381/2006) (Anexo 3).

## 5 RESULTADOS

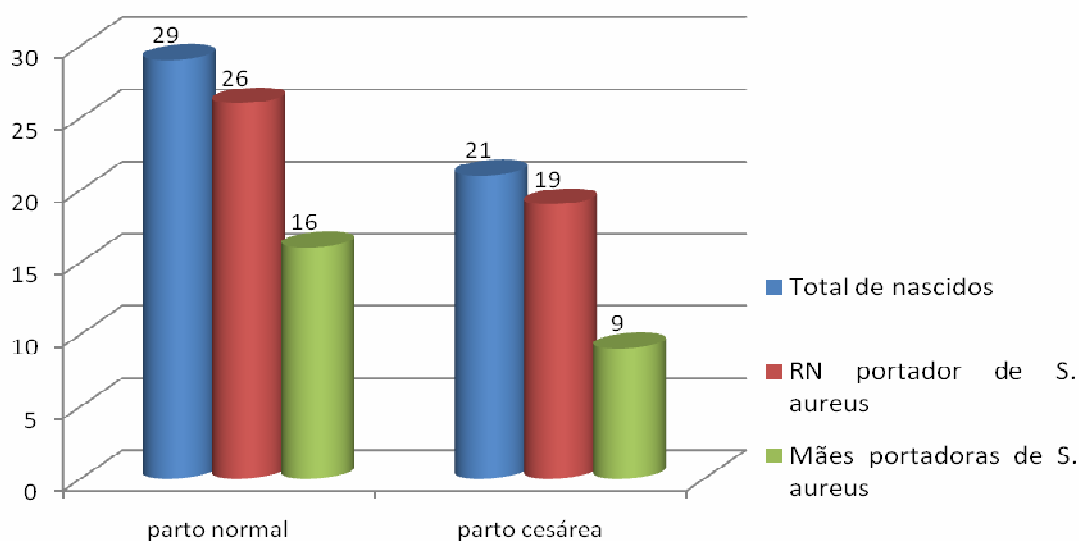
No período de janeiro a abril de 2007, entre as 50 parturientes atendidas no Hospital Universitário do Norte do Paraná, 29 (58%) tiveram recém-nascidos do sexo masculino e 21 (42%) do sexo feminino. O parto normal prevaleceu, com 58% (29), em relação ao parto cesáreo, com 42% (21). Em relação à faixa etária materna, 18% das parturientes tinham entre 14 e 19 anos, 64% tinham entre 20 e 28 e 18% tinham entre 31 e 40 anos. A idade gestacional variou de 34 a 42 semanas, sendo que para 42% das gestantes a idade gestacional foi de 39 semanas. Houve apenas um caso de gestação com 34 semanas e um com 42 semanas.

Entre as 50 parturientes amostradas, 56% (28/50) tiveram cultura positiva para *S. aureus*, e entre os 50 recém-nascidos, 90% (45/50) proporcionaram o isolamento do microrganismo. Considerando-se o binômio mãe/recém-nascido, houve concomitância de isolamento do microrganismo em 50% casos (25/50). A positividade de recém-nascidos para *S. aureus* na primeira coleta, imediatamente após o nascimento, foi de 24% (12/50); na segunda coleta obteve-se uma taxa de positividade de 72% (36/50), e na terceira coleta, com 15 dias de nascido, uma taxa de 90% (45/50).

*Em se tratando do tipo de parto, observamos que das 29 (do total de 50) crianças nascidas por parto normal, 26 foram carreadoras do microrganismo. Em 16 casos as mães também eram portadoras de S. aureus. Em relação ao parto cesáreo, dos 21 (do total de 50) recém-nascidos, 19 apresentavam o microrganismo e 9 de suas mães também eram carreadoras deste microrganismo. (figura 1)*

Considerando-se o binômio mãe-filho, em 32% dos casos (8/25) houve isolamento de *S. aureus* na primeira coleta; em 44% dos casos (11/25) o isolamento ocorreu na segunda coleta e em 24% dos casos (6/25), na terceira.





**Figura 1.** Relação de carregamento de *S. aureus* entre parto normal e parto cesárea.

Em relação à metodologia empregada para isolamento e identificação de *S. aureus* dos vestibulos nasais dos recém-nascidos observou-se que, das 12 (do total de 50) amostras obtidas na primeira coleta, apenas três (25%) foram isoladas através do plaqueamento direto em ágar manitol salgado, e todas cresceram no segundo plaqueamento após o *swab* ter sido mantido em cultivo de TSB. Na segunda coleta, das 24 amostras obtidas, 10 (41,6%) cresceram no plaqueamento direto em manitol, enquanto todas cresceram após serem mantidas em meio de cultivo TSB. Na terceira coleta, das 9 (100%) amostras, todas cresceram no plaqueamento direto e após cultivo em TSB. (figura 2)

Em relação às mães, considerando-se a metodologia adotada para isolamento e identificação de *S. aureus*, observou-se que das 28 culturas, 21 (75%) cresceram quando plaqueadas diretamente em manitol e 28 (100%) cresceram após terem sido mantidas em TSB.

### **5.1 Teste de resistência à oxacilina através do método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os resultados do teste da CIM, realizado para determinação da susceptibilidade a oxacilina, mostrou que, das 73 amostras de *S. aureus* obtidas das mães (28) e dos recém-

nascidos (45), sete (9,6%) foram consideradas resistentes. Dentre estas 7 amostras, 2 foram procedentes de mães e 5 de recém-nascidos. As duas mães identificadas como carreadoras não formaram binômio com os recém-nascidos. Os resultados da CIM das 07 amostras de *S. aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de recém-nascidos e da aréola/mamilo de mães atendidos no Hospital Universitário do Norte do Paraná de fevereiro a abril de 2007 são mostrados na tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados do teste de Determinação da CIM das 07 amostras de *S. aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de recém-nascidos e da aréola/mamilo de mães atendidas no Hospital Universitário do Norte do Paraná de fevereiro a abril de 2007.

Agente antimicrobiano	CIM <sub>mínimo</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM <sub>máximo</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Oxacilina</b>			
Criança (ao nascer)	$\leq 2$	$\geq 4$	8
Criança (48-72h)	$\leq 2$	$\geq 4$	8
Criança (48-72h)	$\leq 2$	$\geq 4$	8
Criança (15 dias)	$\leq 2$	$\geq 4$	8
Criança (15 dias)	$\leq 2$	$\geq 4$	8
Mãe	$\leq 2$	$\geq 4$	8
Mãe	$\leq 2$	$\geq 4$	4

## 5.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de discodifusão

Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana das sete amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina, realizado pelo método da CIM, mostraram que todas foram sensíveis ao linezolid, vancomicina, mupirocina e telitromicina e resistentes a cefoxitina. Uma amostra identificada como resistente a oxacilina pelo método de Agar-diluição mostrou-se sensível a esta droga pelo método de discodifusão. Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana das sete amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes aos antimicrobianos usualmente empregados na rotina clínica são mostrados na tabela 2.

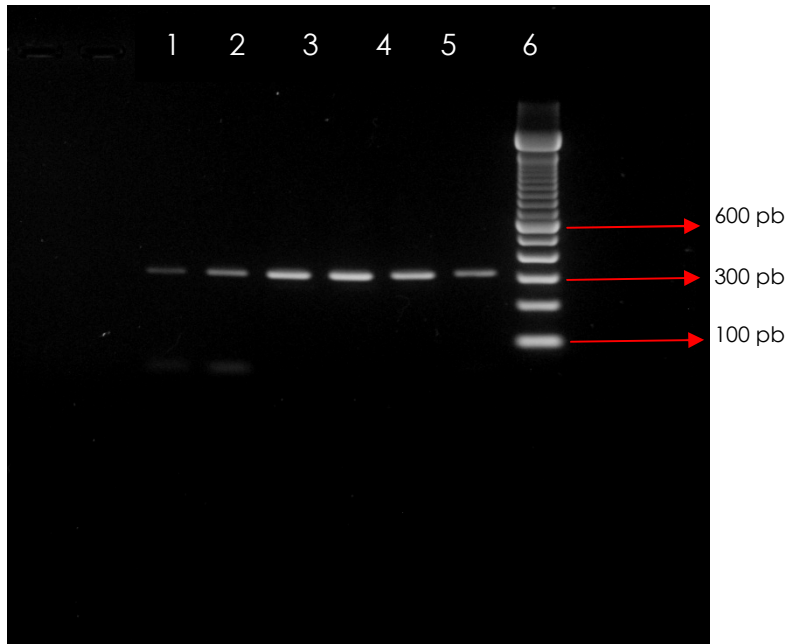
**Tabela 2.** Resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana das 7 amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina aos antimicrobianos usualmente empregados na rotina clínica.

Perfis de Susceptibilidade	OXA	CEF	GEN	LIN	VAN	TET	CIP	MUP	TEL
Criança	R	R	R	S	S	R	S	S	S
Criança	R	R	R	S	S	R	R	S	S
Criança	R	R	R	S	S	R	R	S	S
Criança	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Criança	R	R	S	S	S	S	R	S	S
Mãe	R	R	S	S	S	S	R	S	S
Mãe	R	R	R	S	S	R	S	S	S

S: sensível; R: resistente; OXA: oxacilina; CEF: cefoxitina; GEN: gentamicina; LIN: linezolid; VAN: vancomicina; ; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; MUP: mupirocina; TEL: telitromicina.

### 5.3 Detecção do gene *MecA*

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada para a detecção do gene *mecA*, demonstrou a presença do gene nas 6 amostras de *S. aureus* identificadas como resistentes a oxacilina pelo método da CIM. A figura 2 mostra os resultados obtidos com a técnica de PCR para determinação do gene *mecA* em amostras de *S. aureus* isoladas de recém-nascidos e mães atendidas num Hospital Universitário do Norte do Paraná de fevereiro a abril de 2007.



**Figura 2 - Reação em cadeia de polimerase para determinação do gene *mecA* em amostras de *S. aureus* isoladas de recém-nascidos e mães atendidas num Hospital Universitário do Norte do Paraná de fevereiro a abril de 2007 – canaleta 7: marcador de peso molecular (100pb DNA ladder, Invitrogen); canaleta 6: isolado de criança após o nascimento; canaleta 5 e 3: isolado de mãe; canaleta 1 e 4: isolado de criança com 48-72h após o nascimento; canaleta 2: isolado de criança com 15 dias de vida.**

## 6 DISCUSSÃO

*S. aureus* é reconhecido como um dos principais patógenos, sendo considerado como membro persistente da microbiota endógena humana e relacionado a importantes processos infecciosos. Entre 20 e 70% da população adulta são portadores de *S. aureus* nas fossas nasais, sendo que em recém-nascidos esta porcentagem é expressivamente maior nas primeiras semanas após o nascimento, podendo atingir 100% nas crianças no quarto dia de vida (CIMOLAI, 2003; VON EIFF et al., 2001).

Neste estudo identificaram-se 56% (28) de mães positivas para *S. aureus* na aréola/mamilos e 90% (45) de recém-nascidos carregando o microrganismo nos vestíbulos nasais. Entre os recém-nascidos observou-se um aumento da taxa de carregamento com o passar do tempo, ou seja, ao nascer obteve-se uma taxa de 24%; com 48 a 72 horas esta frequência subiu para 63%; e aos 15 dias após o nascimento o valor obtido foi de 64%. Estudos têm relatado que, entre recém-nascidos, o total de carregadores, nas primeiras semanas de vida, pode atingir 100% no quarto dia de vida (VON EIFF et al., 2001). Rosenthal et al., (2006), estudando a colonização nasal entre um grupo de 50 crianças, relatam que 4 delas tinham sido colonizadas até 7 dias após o nascimento, 9 entre 8 e 14 dias, 21 entre 15 e 21 dias, 13 entre 22 e 28 dias, e 3 foram colonizadas com mais de 4 semanas.

Com relação ao carregamento de *S. aureus* na pele e nas mucosas, alguns estudos confirmaram a transmissão cruzada de *S. aureus* oxacilinarresistente (ORSA) entre irmãos, sendo que um deles havia sido previamente admitido no hospital meses antes com infecção por ORSA. Em uma análise mais acurada os autores demonstraram que a transmissão ocorreu pelo menos três vezes dentro desta família e que pelo menos um familiar foi colonizado com a mesma cepa durante sete meses ou mais (HOLLIS et al., 1995). Uma vez que os recém-nascidos estão em contato permanente com os estafilococos e seu sistema imune ainda não se encontra totalmente desenvolvido, há necessidade de se destacar a possibilidade de aquisição de cepas multirresistentes por contato (LOWY, 1998; LEWIS; WILSON, 2001).

O seio materno é especialmente propenso a ser colonizado por *S. aureus* durante o processo de amamentação, provavelmente devido ao aumento da umidade no local (ZDRAZILEK et al., 1988). A transmissão de *S. aureus* entre mães saudáveis e seus recém-nascidos durante a amamentação foi constatada em estudo realizado por Kawada et al. (2003), alcançando uma taxa de 50% na transmissão entre os pares. Lindberg et al. (2004) também relataram o carregamento de *S. aureus* tanto nos vestíbulos nasais de mães, quanto na região do

mamilo, ressaltando que o ato de amamentar pode contribuir para a aquisição de *S. aureus* pelos lactentes.

O isolamento de *S. aureus*, neste estudo, foi desenvolvido a partir do uso de duas técnicas. Na primeira foi realizada a semeadura direta do material biológico na superfície de ágar manitol salgado, e na segunda, antes da semeadura, o material foi mantido em meio de cultivo de TSB por 24 horas. Em relação ao isolamento de *S. aureus* dos vestíbulos nasais entre recém-nascidos, observou-se um incremento de 51% quando as culturas foram mantidas por 24 horas em caldo de enriquecimento, ou seja, haveria uma perda de 48,9% (23) caso as culturas não houvessem sido mantidas em meio enriquecido. Cookson, Webster e Philips (1987), em estudo realizado com 26 carreadores de ORSA, relataram que, na vigência de semeadura direta, na ausência de enriquecimento em caldo, observaram uma perda de 8 indivíduos que foram identificados como não carreadores. Sautter, Brown e Mattman (1988) encontraram que a metodologia que emprega o uso de caldo seletivo antes do plaqueamento direto provou ser mais eficiente para a recuperação de *S. aureus* nas narinas, onde o incremento foi de 20%. Ainda em relação ao isolamento de *S. aureus*, outros autores têm sugerido o uso de enriquecimento em caldo antes do plaqueamento (POLAKOFF et al., 1967; COOKSON; WEBSTER; PHILLIPS, 1987). O incremento da sensibilidade das técnicas, para isolamento de *S. aureus*, é de fundamental importância para a detecção de indivíduos ou grupos de alto risco e particularmente útil para o monitoramento do transporte de ORSA (COOKSON; WEBSTER; PHILLIPS, 1987; CAMPOS, 1988; LEE et al., 2007).

*S. aureus* que apresentam resistência a oxacilina são, freqüentemente, resistentes a alguns grupos de agentes antimicrobianos mais comuns, como os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas (MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2000), e constituem-se em grande risco para o homem e animais em casos de infecção (NEVES et al., 2007). A identificação de cepas ORSA procedentes da comunidade intra-hospitalar ou de pacientes internados tem ocorrido com freqüência cada vez maior, e atualmente um percentual importante destas cepas também tem sido isolado de indivíduos saudáveis na comunidade (NEVES et al., 2007). A vigilância epidemiológica neste caso é importante, em função da ocorrência de infecção cruzada e da disseminação destas estirpes.

Neste estudo as amostras de *S. aureus* isoladas de mães e de seus respectivos recém-nascidos saudáveis foram, inicialmente, avaliadas quanto à susceptibilidade a oxacilina através de método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por agardifusão e pelo método de difusão em disco com o uso de alguns antimicrobianos conforme recomendação do NCCLS.

Através da CIM, foi possível detectar sete amostras resistentes a oxacilina: cinco crianças e duas mães. Entre as crianças, duas eram culturas obtidas após 15 dias do nascimento, duas eram culturas de 48 horas após o nascimento e uma era de cultura logo após o nascimento. Por outro lado, através do teste de susceptibilidade antimicrobiana realizado pelo método de discodifusão, verificou-se que, das sete amostras, apenas seis culturas foram identificadas como resistentes. Pelo resultado obtido, fica evidente a proposição do NCCLS (2003) de que os resultados dos testes realizados pelo método de discodifusão devem ser correlacionados com os resultados do teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), empregando-se cepas-padrão (ATCC) reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos.

O termo infecção por CA-ORSA refere-se a uma infecção que se origina na comunidade (CHAMBERS, 2001). Atualmente existem controvérsias na literatura para definir a infecção causada por cepas CA-ORSA. O período de isolamento e identificação de ORSA, história e tempo de hospitalização do paciente, como também exposições ou não a fatores de risco, adicionam variáveis que auxiliam na definição. É possível que a origem destas estirpes seja hospitalar e que elas tenham sido propagadas para a comunidade (SALGADO; FARR; CALFEE, 2003).

Vários estudos relatam uma significativa prevalência de ORSA, ocasionando colonização ou infecção entre crianças e adultos (NAKAMURA et al., 2002), e principalmente a presença de números crescentes de pacientes com CA-ORSA que não parecem demonstrar fatores de risco evidente (GORAK; YAMADA; BROWN, 1999; NAKAMURA et al., 2002). Relatórios de mortes pediátricas em consequência de CA-ORSA continuam avançando, ilustrando dessa forma a seriedade potencial deste aparecimento (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999).

Em nosso estudo observou-se que os antimicrobianos mais ativos contra ORSA foram linezolid, com 100% de sensibilidade, vancomicina (100%), mupirocina (100%) e telitromicina (100%). A resistência das amostras a cefoxetina foi 100%, seguida da oxacilina (85,7%), gentamicina (57%), tetraciclina (57%) e ciprofloxacina (57%). Segundo alguns estudos, o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de amostras ORSA de origem hospitalar tem sido semelhante àquele de isolados de CA-ORSA adquiridos na comunidade (HEROLD et al., 1998; SKIEST et al., 2007).

Em relação a vancomicina, em nosso estudo, a taxa de sensibilidade bacteriana foi de 100%. A vancomicina permaneceu como droga de última escolha para o tratamento de ORSA até recentemente (CUI et al., 2006). O aparecimento, em 1996, de *S. aureus*

vancomicina intermediário (VISA) com um MIC de 8 mg/l despertou grande preocupação entre pesquisadores de todo o mundo, os quais preconizaram a vigilância epidemiológica. VISA está se tornando prevalente em vários países, como o Japão, (CUI et al., 2006), a França (CHESNEAU, et al., 2000), os Estados Unidos (SMITH et al., 1999), o Brasil (OLIVEIRA et al., 2001), a Alemanha (REIPERT et al., 2003) e a China (LU et al., 2005).

Técnicas de descontaminação nasal têm sido utilizadas por indivíduos saudáveis como medida preventiva à aquisição de infecção por *S. aureus*, embora ainda exista um risco pequeno de se contrair a infecção (MAINOUS et al., 2006). Mupirocin tópico é um agente bactericida com atividade contra *S. aureus* que foi prosperamente usado para erradicação nasal e colonização em mãos de pacientes e trabalhadores da saúde (DOEBBELING, 1993). A diminuição da colonização pode reduzir as taxas de infecção em pacientes que se submetem a hemodiálise ou cirurgia cardíaca e em indivíduos com infecção de pele (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997).

Doebbeling (1993) destaca que a terapia com unguento nasal de mupirocin pode ser efetiva para a erradicação temporária de *S. aureus* dos vestibulos nasais. Quando aplicado duas vezes ao dia durante cinco dias sucessivos, resulta em eliminação de 91% logo após a aplicação; 87% de eliminação ocorrem depois de quatro semanas, e 48% depois de seis meses. Não obstante, apesar das altas taxas de eliminação, um estudo clínico encontrou pequena ou nenhuma eficácia desta droga na prevenção de infecções de *S. aureus* (PERL et al., 2002).

É imperativo que o uso de mupirocin seja restringido a casos em que seja absolutamente necessário, tornando-se indispensável que um programa de vigilância contínua de ORSA seja realizado regularmente nos serviços de saúde (CUI et al., 2006).

A descoberta de resistência a oxacilina entre estafilococos baseada em métodos fenotípicos constitui-se em um processo complexo, principalmente em populações heterogêneas. Além disso, estafilococos multirresistentes que abrigam o gene *mecA* realçam a importância de determinação precisa deste mecanismo de resistência (PALAZZO; REHDER; DARINI, 2007).

A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios. Fazem parte dos mecanismos de resistência à oxacilina a hiperprodução de betalactamases, a presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP *protein binding penicilin*) alterada denominada PBP2a e modificações na capacidade de ligação das PBPs. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos



estafilococos a oxacilina e a todos os antibióticos betalactâmicos (CHAMBERS, 1997). O determinante gênico da proteína PBP2A é o gene *mecA*, que é constituído por cerca de 2000 pares de nucleotídeos. Este gene não é nativo de *S. aureus*, e assim só as estirpes resistentes o possuem. Em contraste com o determinante da penicilinase, que em muitos casos ainda se mantém em plasmídeos, embora também possa existir no cromossomo, o gene *mecA*, ocorre sempre integrado no cromossomo de *S. aureus* (LENCASTRE et al., 1994).

Através da amplificação de determinados genes e subsequente análise genética dos fragmentos, podem ser obtidas informações da filogenia e da sistemática microbiana, de uma maneira rápida e eficiente (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997). A amplificação da região hipervariável do gene *mec* mostrou ser útil para o estabelecimento da origem de infecção nosocomial (SCHMITZ et al., 1998), e a técnica tem sido utilizada para a ampliação simultânea dos genes *Meca* e *femA* e do gene da termonuclease extracelular e PBP2 (MENEGOTTO; PICOLI, 2007).

Estudo realizado para identificar a resistência a oxacilina através de métodos fenotípicos, tais como agardiluição e discodifusão, comparados com métodos genotípicos, tais como a presença do gene *mecA*, pela PCR, demonstra que resultados contraditórios podem ser encontrados no que diz respeito à susceptibilidade antimicrobiana, salientando a importância da confirmação de resistência através de técnicas laboratoriais especializadas (KOTILAINEN et al., 1995).

Em nosso estudo foi possível observar que, das sete amostras resistentes a oxacilina, 100% foram portadoras do gene *mecA*. Resultado semelhante foi descrito por LO et al. (2007), que, testando nove cepas de CA-ORSA pelo método de discodifusão, observou que todas foram positivas para o gene *mecA*. Para Geha et al. (1994), a técnica de PCR para determinação do gene *mecA*, torna-se um instrumental benéfico em estudos de susceptibilidade, pois permite a identificação de resistência intrínseca de maneira confiável e segura.

## 7 CONCLUSÃO

O estudo permitiu chegar aos dados descritos a seguir.

- Foi identificada uma alta prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* entre recém-nascidos atendidos num hospital universitário do Norte do Paraná.
- Dos recém-nascidos participantes do estudo, 58% eram do sexo masculino e 42% do sexo feminino. O parto normal obteve uma taxa de 58%, enquanto o parto cesáreo obteve uma taxa de 42%.
- A frequência de carreamento nasal de *S. aureus* entre os recém-nascidos foi crescente a partir do nascimento até os primeiros quinze dias.
- A taxa de recém-nascidos portadores do microorganismo nascidos de parto normal foi de 89,6%, ao passo que os nascidos de parto cesárea foram de 90,4%.
- Entre o grupo de mães carreadoras de *S. aureus* na aréola/mamilo observou-se que foi alto o percentual de seus respectivos recém-nascidos que também carregaram o microorganismo nos vestíbulos nasais.
- A utilização de meio de enriquecimento de TSB antes da semeadura em meio sólido incrementou o isolamento de *S. aureus* entre recém-nascidos e mães.
- No teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de discodifusão, 100% das amostras foram sensíveis a linezolid, vancomicina, mupirocina e telitromicina.
- Observou-se que 100% das amostras foram resistentes a cefoxitina.
- Através do teste de susceptibilidade antimicrobiana realizado pelo método da CIM, observou-se que 9,6% das amostras de *S. aureus* foram consideradas resistentes a oxacilina.
- A técnica de PCR para a detecção do gene *MecA* confirmou a resistência a oxacilina das 7 amostras de *S. aureus* identificadas como resistentes pela técnica da CIM.
- O teste de susceptibilidade antimicrobiana realizado através da técnica de discodifusão concordou em 85,7% com a técnica da CIM para a identificação de amostras resistentes a oxacilina.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atenção à saúde é constantemente desafiada por infecções causadas por microrganismos altamente virulentos e capazes de desencadear surtos graves em todos os setores das instituições de saúde. Atualmente, o portador são ou assintomático tem sido considerado uma importante fonte de microrganismos, tornando-se, dessa forma, a mais silenciosa ameaça de propagação de infecções.

Este estudo teve como objetivo geral trazer uma contribuição para a epidemiologia no que diz respeito ao carreamento de *S. aureus* entre recém-nascidos saudáveis e suas respectivas mães, particularmente aqueles resistente a oxacilina.

A partir da população em estudo foi possível observar que 90% dos recém-nascidos foram carreadores de *S. aureus*, que 11,1% destes foram identificados como portadores de ORSA e que entre as mães a frequência de carreamento foi de 56%.

Destarte, os profissionais de saúde precisam estar particularmente atentos para a identificação de carreadores de *S. aureus*; e como estão diretamente envolvidos no cuidado com clientes, devem tomar precauções para controlar e prevenir sua disseminação.

Diante dessa premissa, ressalta-se a importância da conscientização da necessidade de planejamento, implementação e avaliação de medidas direcionadas ao controle de *S. aureus* multirresistentes e, conseqüentemente, das estafilococcias.

Este estudo possibilita uma reflexão a respeito de técnicas de descontaminação nasal, como medidas preventivas em indivíduos saudáveis, pois, embora eles tenham um risco pequeno de contrair infecção, são portadores do microrganismo.

Espera-se que os resultados desta pesquisa possam despertar nos profissionais uma visão da problemática que os *S. aureus*, particularmente os ORSA ou CA-ORSA, representam na atualidade. Especialmente o enfermeiro, que atua diretamente na prestação de cuidados, precisa ser conscientizado da necessidade de ter mais conhecimento sobre a microbiologia, no sentido amplo do aprender, de saber pensar para melhor criar, participar, refletir, criticar, construir e inovar para mudar. Ele precisa ter a certeza da necessidade de se adotar uma postura científico-histórico-crítica, que permita atuar sobre as causas do problema, e não somente sobre seus sintomas (SANTOS, 1997).

## REFERÊNCIAS

- ADELBERG, E.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L. **Microbiologia médica**. 20. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1995.
- AMIR, L. H.; GARLAND, S. M.; LUMLEY, J. A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. **BMC Family Practice**, London, v. 7, p. 57, 2006
- ANDERSON, G. W.; ARNSTEIN, M. G.; LESTER, M. R. **Control de enfermidades transmisibles**. 4. ed. México, DF : Méxica Interamericana, 1965. p.330-339.
- ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de Biologia Molecular**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 49 f.
- APPELBAUM, P. C. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, Suppl. 3, p. 165-170, 2007.
- APPERE DE VECCHI, C.; MERRER, J.; SANTOLI, F.; TRAY, B.; JONGHE, B.; OUTIN, H. Colonization pressure and risk of acquisition of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. **Infection control and hospital epidemiology**, New Jersey, v.21, no.11, p. 718-23, 2000.
- AUBRY-DAMON, H.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996 to 1998. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, no. 3, p. 315-20, 1999.
- BEHARI, P.; ENGLUND, J.; ALCASID, G.; GARCIA-HOUCHINS, S.; WEBER, S. Transmission of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* to preterm infants through breast milk. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 9, no. 9, p. 778-780, 2004.
- BENDIT, I.; GIGLIO, A. D.; NETO, D. G. Conceitos básicos de biologia molecular – parte II. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, Recife, n. 5, p. 32, 1999.
- BJORKSTEN, B.; BURMAM, L. G.; CHATEAU, P. F.; GOTHEFORS, L.; HERNELL, O. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? **British Medical Journal**, London, v. 281, no. 25, p. 778-780, 1980.
- BOYCE, J. M.; MUTO, C. A.; JERNIGAN, J. A.; OSTROWSKY, B. E.; RICHET, H. M.; JARVIS, W. R. et al. Gideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant straisns of *staphylococcus aureus* and entereococcus. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 24, no. 5, p. 362-86, 2003.
- BRADLEY, S. F.; TERPENNING, M. S.; RAMSEY, M. A.; ZARINS, L. T.; JORGENSEN, K. A.; SOTTILE, W. S.; SCHABERG, D. R.; KAUFFMAN, C. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 115, no. 6, p. 417-22, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Série A: normas e manuais técnicos**. OPAS/OMS, 1985. p. 103.

CAMPBELL, J. R.; ZACCARIA, E.; MASON, E. O.; BAKER, C. J. Epidemiological analysis defining concurrent outbreaks of *Serratia marcescens* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. **Infection control and hospital epidemiology**, New Jersey, v. 19, no. 12, p. 924-928, 1998.

CAMPOS, J. M. Detection of *S. aureus* colonization using a selective medium. **Diagnostic Testing Alert**, Atlanta, v. 4, p. 23, 1988.

CARBON, C. Costs of treating infections caused by methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 44, p. 31-36, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION-CDC. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 23 jul. 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION-CDC. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota and North Dakota, 1997-1999. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 282, no. 12, p. 1123-1125, 1999.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 10, no. 4, p.781-791, 1997.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, no. 2, p. 178-82, 2001.

CHESNEAU, O.; MORVAN, A.; SOLH, N.E. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 45, no.6, p. 887-890, 2000.

CIMOLAI, N. *Staphylococcus aureus* outbreaks among newborns: new frontiers in and old dilemma. **American Journal of Perinatology**, New York, v. 20, no. 3, p. 125-36, 2003.

COOKSON, B. D.; WEBSTER, M.; PHILLIPS, I. Control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v.1, no. 8534, p. 696, 1987.

CORSO, A.; SANTOS, I.; AIRES DE SOUSA, M.; ROSSI, A.; LENCASTRE, H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 4, no. 4, p. 277-288, 1998.

COSGROVE, S. E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E. N.; SCHWABER, M. J.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 36, no. 1, p. 53-59, 2003.

CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, J. Q.; NEOH, H. M.; ARUYAMA, T.; HORIKAWA, Y.; HIRAMATSU, K. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-

intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 50, no. 2, p. 428-438, 2006.

DAVIES, E. A.; EMMERSON, A. M.; HOGG, G. M.; PATTERSON, M. F.; SHIELDS, M. D. An outbreak of infection with a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a special care baby unit: value of topical mupirocin and of traditional methods of infection control. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 10, no. 2, p. 120-128, 1987.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; WOOD, W. B. Relações hospedeiro-parasita nas doenças bacterianas. In: DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; WOOD, W. B. **Microbiologia**. São Paulo: Edart, 1973. p. 9-54.

DIAS, C.; BERQUÓ, L. S. Resistência à mupirocina em pacientes colonizados com MRSA em terapia intensiva de adulto em hospital privado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR, 8., 2002, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ABIH, 2002. p. 256.

DOEBBELING, B. N. Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. The mupirocin collaborative study group. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 17, no. 3, p. 466-74, 1993.

DOMINGUEZ, M. A.; LENCASTRE, H.; LINARES, J.; TOMASZ, A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 32, no. 9, p. 2081-2087, 1994.

DUBIN, D. T.; MATTHEWS, P. R.; CHIKRAMANE, S. G.; STEWART, P. R. Physical mapping of the *mec* region of an American methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC v. 35, no. 8, p. 1661-1665, 1991.

ENGEMANN, J. J.; CARMELI, Y.; COSGROVE, S.E. et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 36, no. 5, p. 592-598, 2003.

FORATTINI, O. P. As doenças transmissíveis. In: FORATTINI, O. P. **Epidemiologia geral**. São Paulo: Edgard Blucher, 1986. p. 191-206.

GEHA, D. J.; UHL, J. R.; GUSTAFERRO, C. A.; PERSINGI, D. H. Multiplex PCR for Identification of Methicillin-Resistant Staphylococci in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 32, no. 7, p. 1768-1772, 1994.

GILBERT, P. Principles of microbiol pathogenicity and epidemiology. In: HUGO, W. B.; RUSSEL, A. D. **Pharmaceutical microbiology**. 5<sup>th</sup> ed. London: Blackwell Scientific, 1992. p. 82-96.

GOLD, H. S.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial-drug resistance. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 335, no. 19, p. 1445-1453, 1996.

- GORAK, E. J.; YAMADA, S. M.; BROWN, J. D. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 29, no. 4, p. 797-800, 1999.
- GRAHAM, D. R.; CORREA-VILLA SENOR, A.; ANDERSON, R. L.; VOLLMAN, J. H.; BAINE, W. B. Epidemic neonatal gentamicin-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection associated with nonspecific topical use of gentamicin. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 97, no. 6, p. 972-978, 1980.
- HADDADIN, A. S.; FAPPIANO, S. A.; LIPSETT, P. A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, v. 78, no. 921, p. 385-96, 2002.
- HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 158, no. 2, p. 513-516, 1984.
- HARTSTEIN, A. I.; MULLIGAN, M. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: MAYHALL, C. G. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 290-306.
- HEALY, C. M.; HULTEN, K. G.; PALAZZI, D. L.; CAMPBELL, J. R.; BAKER, C. J. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 39, no. 10, p.1460-1466, 2004.
- HEROLD, B. C. et al. Community-acquired Methicillin resistant with no identified predisposing risk. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 279, no. 8, p. 593-598, 1998.
- HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H; KAWASAKI, S; HOSODA, Y; HORI, S. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, London, n. 350, p. 670-1673, 1997
- HOLLIS, R. J.; BARR, J. L.; DOEBBELING, B. N.; PFALLER, M. A.; WENZEL, R. P. Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 21, no. 2, p. 328-332, 1995.
- 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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 48, no. 7, p. 2637-2651, July 2004
- ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC v. 45, no. 5, p. 1323-1336, 2001.
- JAFFAR, A.; TAWFIQ, A. L. Father-to-infant transmission of community-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 27, no. 6, p. 636-637, 2006.

JERNIGAN, J. A.; CLIMENCE, M. A.; STOTT, G. A.; TITUS, M. G.; ALEXANDER, C. H.; PALUMBO, C. M. et al. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital: one decade later. **Infection control and hospital epidemiology**, New Jersey, v. 16, no. 12, p. 686-696, 1995.

JERNIGAN, J. A.; TITUS, M. G.; GROSCHEL, D. H.; GETCHELL-WHITE, S.; FARR, B. M. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 143, no. 5, p. 496-504, 1996.

JONES, C. A. Maternal transmission of infectious pathogens in breast milk. **Journal of Pediatric Health Care**, St. Louis, v. 37, no. 6, p. 576-582, 2001.

KAWADA, M.; OKUZUMI, K.; HITOMI, S.; SUGISHITA, C. Transmission of *Staphylococcus aureus* between healthy, lactating mothers and their infants by breastfeeding. **Journal of Human Lactation**, Charlottesville, v. 19, no. 4, p. 411-7, 2003.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 10, no. 3, p. 505-520, 1997.

KONEMAM, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. Texto e atlas colorido. 5. ed. São Paulo: Medsi, 2001. p. 551-88.

KOTILAINEN, P.; HYVÄRINEN, J.; JÄRVINEN, H.; LINKO, L.; EEROLA, E.; LEHTONEN, O. P.; SIVONEN, A.; HUOVINEN, P.; VUOPIO-VARKILA, J. Testing of methicillin resistance by in vitro susceptibility and the presence of the *mecA* gene in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Finland. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, no. 5, p. 475-9, 1995.

LALLY, R. T.; EDERER, M. N.; WOOLFREY, B. F. Evaluation of mannitol salt agar with oxacillin as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 22, no. 4, p. 501-504, 1985.

LE THOMAS, I.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; COLLIGNON, A. et al. Breast milk transmission of a Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 39, no. 2, p. 728-729, 2001.

LEE, S.; PARK, Y. J.; EUN-JEE, O. H.; KAHNG, J.; YOO, J. H.; JEONG, I. H.; KWON, Y. M.; HAN, K. Comparison of protocols for surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): medical staff vs ICU patients. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v. 37, no. 3, p. 248-250, 2007.

LENCASTRE, H. et al. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 33, no. 1, p. 7-24, 1994.

LENCASTRE, H.; SEVERINA, E. P.; ROBERTS, R. B.; KREISWIRTH, B. N.; TOMASZ, A. Testing the efficacy of a molecular surveillance network: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) genotypes in six hospitals in the metropolitan New York City area. The barg initiative pilot



study group. Bacterial antibiotic resistance group. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 2, no. 3, p.343–351, 1996.

LENCASTRE, H.; WU, S. W.; PINHO, M. G.; LUDOVICE, A. M.; FILIPE, S.; GARDETE, S.; SOBRAL, R.; GILL, S.; CHUNG, M. ; TOMASZ, A. Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 5, no. 3, p. 163–175, 1999.

LEWIS, D. B.; WILSON, C. Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 25-138.

LINDBERG, E.; ADLERBERTH, I.; HESSELMAR, B.; SAALMAN, R.; STRANNEGÅRD, I. L.; BERG, N.; WOLD, A. E. High Rate of transfer of *staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 42, no. 2, p. 530–534, 2004.

LO, W. T.; LIN, W. J.; TSENG, M. H.; LU, J. J.; LEE, S. Y.; CHU, M. L.; WANG, C. C. Nasal carriage of a single clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among kindergarten attendees in northern Taiwan. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 7, p. 51, 2007.

LOUIE, L.; GOODFELLOW, J.; MATHIEU, P.; GLATT, A.; LOUIE, M.; SIMON, A. E. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 40, no. 8, p. 2786-2790, 2002.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, n. 8, p. 520-32, 1998.

LU, J. J.; LEE, S. Y.; HWA, S. Y.; YANG, A. H. Septic arthritis caused by vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 43, no. 8, p. 4156-4158, 2005.

LUCET, J. C.; CHEVRET, S.; ZALESKI, I. D. et al. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 163, no. 2, p. 181-8, 2003.

MAINOUS, A. G.; HUESTON, W. J.; EVERETT, C. J.; DIAZ, V. A. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in the United States, 2001-2002. **Annals of Family Medicine**, Leawood, v. 4, no. 2, p. 132-137, 2006.

MAMIZUKA, E. M.; OLIVEIRA, G. A. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospital brasileiro. **Revista Pharmacia Brasileira**, Brasília, DF, ano. 3, p. 7-8, 2000.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's practice of infectious diseases**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2069-92.

MARANAN, M. C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 11, no. 4, p. 813–849, 1997.

MELISH, M. E.; CAMPBELL, K. A. Coagulase-positive staphylococcal infections. In: FEIGIN, R. D.; CHERRY, J. D. **Textbook of pediatric infectious diseases**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 1039-66.

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

MITÃO, M.; HAMADA, T.; HIRAI, G. Infection route of MRSA to pregnant women and to newborns. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, Tokio, v. 47, no. 3, p. 231-236, 1995.

MITSUDA, T.; ARAI, K.; FUJITA, S.; YOKOTA, S. Demonstration of mother-to-infant transmission of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Pediatrics**, Heidelberg, v. 155, no. 3, p. 194-199, 1996.

MUDER, R. R.; BRENNEN, C.; WAGENER, M. M. et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 114, no. 2, p. 107-112, 1991.

MUNDIM, G. J.; DEZENA, R. A.; OLIVEIRA, A. C. S.; SILVA, P. R.; CARDOSO, M.; PEREIRA, G. A.; MORAIS, C. A.; TERRA, A. P. C. Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 36, no. 6, p. 685-688, 2003.

NAKAMURA, M. M.; ROHLING, K. L.; SHASHATY, M.; LU, H.; TANG, Y. W.; EDWARDS, K. M. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population. **Journal Pediatric Infectious Disease**, Baltimore, v. 21, no. 10, p. 917-921, 2002.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 8<sup>th</sup> ed. Wayne, 2003. (NCCLS document; M2-A8).

NEVES, M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de staphylococcus spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n. 3, p. 207-213, 2007.

OLIVEIRA, A. L. C.; DAMASCO, P. V.; MELINO, T. L.; SOUZA, D. C.; OLIVEIRA, V. M.; PINTO, A. M.; SOLARI, C. A.; FRAJHOT, L.; FIORAVANTI, F. A.; KLÔH, M. I. Prevalência de MRSA em um Hospital Universitário do RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 32, supl. 1, p. 432, 1999.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 46, no. 7, p. 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A. M.; MASIERO, R. L.; LEVY, C. E.; GOMES, M. S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E. M Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 22, no. 7, 443-448, 2001.

PACCEZ, J. D. **Estudo Clínico das infecções invasivas pelo *staphylococcus aureus* de origem comunitária**. 1997. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 1997.

PALAZZO, I. C. V.; REHDER, A.; DARINI, A. L. C. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 71, no. 3, p. 186-190, 2007.

PEACOCK, S. J.; JUSTICE, A.; GRIFFITHS, D; DE SILVA, G. D.; KANTZANOU, M. N.; CROOK, D.; SLEEMAN, K.; DAY, N. P. Determinants of Acquisition and Carriage of *Staphylococcus aureus* in Infancy. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 41, no.12, p. 5718–5725, Dec. 2003.

PERL, T. M.; CULLEN, J. J.; WENZEL, R. P.; ZIMMERMAN, M. B.; PFALLER, M. A.; SHEPPARD, D.; TWOMBLEY, J.; FRENCH, P. P.; HERWALDT, L. A. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, no. 24, p. 1871–1877, 2002.

POLAKOFF, S. I.; RICHARDS, D. G.; PARKER, M. T.; LIDWELL, O. M. Nasal and skin carriage of *Staphylococcus aureus* by patients undergoing surgical operation. **Journal of Hygiene**, London, v. 65, no. 4, p. 559-566, 1967.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 36-40, 1988.

RAYMOND, J.; BINGEN, E.; BRAHIMI, N. et al. Staphylococcal scalded skin syndrome in a neonate. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 16, no. 6, p. 453-454, 1997.

REIPERT, A.; EHLERT, K.; KAST, T.; BIERBAUM, G. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 47, no.2, 568-576, 2003.

RICARDO, S. B. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na Comunidade. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n. 34, p. 131-134, 2004.

ROSENTHAL, A.; WHITE, D.; CHURILLA, S.; BRODIE, S.; KATZ, K. C. Optimal surveillance culture sites for detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in newborns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 44, no. 11, p. 4234–4236, 2006.

ROUQUARYROL, M. Z.; VERAS, F. M. F. Doenças transmissíveis e modos de transmissão. In: ROUQUARYROL, M. Z. **Epidemiologia e saúde**. 4. ed. Rio de Janeiro: MEDSI- Editora Médica e científica, 1994. p. 217-268.

RYFFEL, C.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHI, B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 36, no. 1, p. 25-31, 1992.

SALGADO, C. D.; FARR, B. M.; CALFEE, D. P. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 36, no. 2, p. 131–139, 2003.

SANCHES, I. S.; LESKI, T.; OLIVEIRA, D.; TRZCINSKI, K.; SOUSA, M. A.; HRYNIEWICZ, W.; LENCASTRE, H. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 36, no. 12, p. 3532–3539, 1998.

SANTOS, N. Q. **Infecção hospitalar uma reflexão histórico-crítica**. Florianópolis: UFSC, 1997.

SAUTTER, R. L.; BROWN, W. J.; MATTMAN, L. H. The use of a selective staphylococcal broth vs direct plating for the recovery of *Staphylococcus aureus*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 9, no. 5, p. 204-205, 1988.

SCANVC, A.; DENIC, L.; GAILLON, S. et al. Duration of colonization by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, no. 10, p. 1393-1398, 2001.

SCHMITZ, F. J. et al. Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburg, v. 47, no. 4, p. 335-340, 1998.

SENNA, J. P. M. ; PINTO, C. A.; CARVALHO, L. P. S.; SANTOS, D. S. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and pcr analysis of polymorphisms on the *mec* hypervariable region for typing methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 40, no. 6, p. 2254–2256, 2002.

SHLR, O. Perfil de sensibilidade do *S. aureus* e *S. epidermidis* no Hospital Municipal Souza Aguiar, 1.semestre de 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 32, supl. 1, p. 423, 1999.

- SKIEST, D. J.; BROWN, K. A. C.; COOPER, B. D.; HOLLY HOFFMAN-ROBERTS, B.; HUDA, R. M. B.; ELLIOTT, A. C. Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. **Journal of Infection**, London, v. 54, no. 5, p. 427-434, 2007.
- SMITH, T. L.; PEARSON, M. L.; WILCOX, K. R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M.V.; ROBINSON-DUNN, B.; TENOVER, F.C.; ZERVOS, M. J.; BAND, J. D.; WHITE, E.; JARVIS, W. R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, no.7, p. 493-501, 1999.
- SOUNIS, E. **Epidemiologia geral**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. p. 1-96
- SOUSA, M. A.; SANCHES, I. S.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; VERBRUGH, H.; LENCASTRE, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 2, no. 3, p. 331-341, 1996.
- STEWART, P. R.; DUBIN, D. T.; CHIKRAMANE, S. G.; INGLIS, B.; MATTHEWS, P. R.; POSTON, S. M. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, New York, v. 31, no. 1, p. 12-20, 1994.
- STOLL, B. J.; HANSEN, N. I.; FANAROFF, A. A. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, Evaston, v.110, no. 2, pt. 1, p. 285-291, 2002.
- TACCONELLI, E.; CARMELI, Y.; AIZER, A.; FERREIRA, G.; FOREMAN, M. G.; D'AGATA, E. M. Mupirocin prophylaxis to prevent *Staphylococcus aureus* infection in patients undergoing dialysis: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, no.12, p. 1629-1638, 2003.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v.33, n. 3, p. 281-301, 2000.
- TODA, E. N. **Estudo da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* isolado no Laboratório Central da Santa Casa de São Paulo, no período de setembro/2000 a março/2002**. 2003 106f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2003.
- TOLEDO, M. R. F. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. p. 105-109.
- TRAUTMANN, M.; STECHER, J.; HEMMER, W.; LUZ, K.; PANKNIN, H. T. Intranasal mupirocin prophylaxis in elective surgery: a review of published studies. **Chemotherapy**, Basel, v. 54, no. 1, p. 9-16, 2008.
- TVETEN, Y.; KRISTIENSEN, B. E.; ASK, E.; JENKINS, A.; HOSFSTAD, T. DNA fingerprinting of isolates of *Staphylococcus aureus* from newborns and their contacts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 29, no.6, p. 1.100-1.105, 1991.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 28. no. 3, p. 397–403, 1985.

VANDENBERGH, M. F. Q.; VERBRUGH, H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. **Journal of Laboratory And Clinical Medicine**, St. Louis, v. 133, no. 6, p. 525-534, 1999.

VANDENBERGH, M. F. Q.; YZERMAN, E. D. P. F.; BELKUN, A. et al. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 37, no. 10, p. 3133-3140, 1999.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J. L. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 33, no. 11, p. 2864-2867, 1995.

VON EIFF, C.; BEKCEK, K.; MACHKA, K.; STAMER, H.; PETERS, G. Nasal carriage as a source of *staphylococcus aureus* bacteremia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 344, no. 1, p. 11-16, 2001.

WALDVOGEL, F. A. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal toxic shock). In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's practice of infectious diseases**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2069-2092.

WELSH, J. K.; MAY, J. T. Anti-infective properties of breast milk. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 94, no. 1, p. 1-9, 1979.

WINSTANLEY, T. G.; EGGINGTON, R.; SPENCER, R. C. Selective medium for MRSA. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 46, no. 12, p. 1140, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Overcoming Antimicrobial Resistance. **World Health Report on Infectious Disease 2000**. Geneva, 2001. p. 1-21.

ZDRAZILEK, J. P.; PETRAS, H.; SRAMOVA, V.; SUBERTOVA,.; MASKOVA, L. *Staphylococcus aureus* at a maternity ward. I. Colonization of mothers and neonates and survival of various *S. aureus* types in colonized individuals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, Praha, v. 32, no. 1, p. 49–57, 1988.

ZELANTE, F. et al *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos sãos. Verificação de identidade entre as cepas isoladas. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, p. 92-96, 1982.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos realizando uma pesquisa intitulada: Aquisição nasal de *Staphylococcus aureus* entre recém-nascidos saudáveis, que tem como objetivo: verificar a ocorrência da aquisição nasal e umbilical de *Staphylococcus aureus* entre recém-nascidos saudáveis.

Os resultados da pesquisa destinar-se-ão à elaboração de trabalho de caráter científico e possível publicação, sendo garantido o anonimato dos participantes.

Estamos disponíveis para fornecer-lhe informações quando julgar necessário, nos comprometendo a proporcionar respostas adicionais sobre qualquer dúvida que por ventura venha a ter e informações atualizadas durante o desenvolvimento do estudo, mesmo que isto possa afetar a sua vontade de continuar participando.

A sua retirada deste processo de pesquisa poderá ocorrer quando considerar conveniente, sendo que isto não lhe acarretará nenhum dano pessoal e/ou profissional.

Informo que não haverá riscos, nem danos ou custos de qualquer natureza caso concorde em participar do estudo, assim como não receberá pagamento pela participação. O presente projeto está em concordância com as exigências da Resolução 196/96, que regulamenta a realização de pesquisa com seres humanos.

Em caso de reclamação e/ou denúncia, procure o pesquisador, João Bedendo pelo telefone (0xx44) 3261-4511, da Universidade Estadual de Maringá, e/ou o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá, na Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo telefone (0xx44) 3261-4444.

Eu, \_\_\_\_\_, após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE em participar desta pesquisa.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante.

Eu, Pesquisadora \_\_\_\_\_, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo.



**Anexo 2****Formulário de Identificação do Paciente**

- 1) Paciente nº (    )
- 2) Data e hora do nascimento    \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_    \_\_\_\_ : \_\_\_\_
- 3) Idade e nome da mãe \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_
- 4) Nome da criança \_\_\_\_\_
- 5) Número do prontuário \_\_\_\_\_
- 6) Idade Gestacional \_\_\_\_\_
- 7) Sexo da criança            (    )M                    (    )F
- 8) Parto                        (    ) Normal            (    ) Cesárea
- 9) Ápgar                        (    ) 1º min            (    ) 5º min
- 10) Peso no nascimento \_\_\_\_\_
- 11) Estatura no nascimento \_\_\_\_\_
- 12) Data provável da alta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_
- 13) Peso na alta \_\_\_\_\_
- 14) Endereço: \_\_\_\_\_
- 15) Fone: \_\_\_\_\_
- 16) Data do agendamento da visita: \_\_\_\_\_

**Anexo 3**  
**(Xerox do comitê de ética)**