

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública

Maria Aparecida da Silva Vieira

Estudo epidemiológico e molecular de portador nasal de
Staphylococcus aureus e de *Staphylococcus aureus* metilina-
resistente em Pronto Atendimento Pediátrico e em Unidades de
Terapia Intensiva Neonatal de Goiânia

Orientadora:
Profª. Dra. Ana Lucia S. S. de Andrade

Tese de Doutorado

Goiânia-GO, 2010.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Maria Aparecida da Silva Vieira

Estudo epidemiológico e molecular de portador nasal de
Staphylococcus aureus e de *Staphylococcus aureus* meticilina-
resistente em Pronto Atendimento Pediátrico e em Unidades de
Terapia Intensiva Neonatal de Goiânia

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Lucia S. S. de Andrade

Tese submetida à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em medicina tropical e saúde pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, área de concentração: Epidemiologia.

Este trabalho foi realizado com recursos do Conselho Nacional para o desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e apoio do Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde (IATS).

Tese de Doutorado

Goiânia-GO, 2010.

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)**

F825f Vieira, Maria Aparecida da Silva.
Estudo epidemiológico e molecular de portador nasal de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente em Pronto Atendimento Pediátrico e em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal de Goiânia [manuscrito] / Maria Aparecida da Silva Vieira. – 2010.
xvi, 96 f.: Il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lucia S. S. Andrade.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.

Bibliografia f. 53-72.

Inclui lista de tabelas, quadros, figuras e abreviaturas.

Anexos.

1. *Staphylococcus aureus* - Crianças
2. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina - Unidades de Terapia Intensiva Neonatal Crianças - Serviços Médicos de Emergência
3. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
4. Epidemiologia Molecular I. Andrade, Ana Lucia S. S. de II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU:

*A menos que se admita a existência de Deus,
a questão a que se refere ao propósito
para a vida não tem sentido.*

Bertrand Russell, ateu

Deus não joga dados.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus,
pela presença constante em minha vida!
Muito obrigada Senhor!*

*E aos meus pais,
Sebastião e Magnólia por estarem sempre ao meu lado.
Mãezinha, obrigada pelas suas orações!*

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Esse trabalho é fruto de uma construção coletiva.

À minha orientadora **Profa. Dra. Ana Lúcia Andrade**, exemplo de pesquisadora, agradeço o apoio, a disponibilidade, a partilha do saber e pelas oportunidades que transformaram minha carreira. Minhas vitórias nesta etapa de minha vida, divido-as com você.

À **Dra. Ruth Minamisava**, que me acompanhou em todas as fases deste trabalho, assim como acompanha as demais coisas da minha vida. Obrigada pela companhia diária, cumplicidade e carinho.

Ao **Prof. Renato Maurício de Oliveira**. Muito obrigada pela sua amizade, aprendizado de vida e pelo carinho recebido. Esse tempo passado ao seu lado me transformou numa pessoa melhor.

Ao **Prof. Dr. André Kipnis** pela disponibilidade, pelo espírito científico, pelas sugestões valiosas durante toda a condução do estudo que com certeza contribuíram para a qualidade desse trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Cláudia C. Dantas** pela alegria, leveza na convivência e total disponibilidade na transferência do conhecimento.

Ao **Dr. Vicente Porfírio Pessoa Jr.**, pelo compartilhamento de alegrias, dificuldades e conhecimentos, pelo carinho e amizade verdadeira.

À **Dra. Sabrina S. Andrade**, pelo companheirismo, amizade e participação efetiva no desenvolvimento deste trabalho.

À **Dra. Juliana Lamaro-Cardoso** pela relevante contribuição na realização dos testes moleculares, fundamentais para a realização desse estudo.

Ao **Yves Mauro Ternes**, pela amizade e enorme contribuição nos experimentos deste estudo.

À todos os membros da banca de qualificação, especialmente à **Profa. Marília Dalva Turchi**, **Prof. André Kipnis** e **Prof. Paulo Sucasas**, pela leitura cuidadosa e pelas valiosas sugestões, que foram imprescindíveis para a finalização desse trabalho.

À **Dra. Soraya S. Andrade**, pela sua disponibilidade, apoio e carinho com que nos auxiliou durante a elaboração deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Bosco Siqueira Jr.**, obrigada pela amizade, acolhimento, bom humor e pela convivência agradável.

Ao **Prof. Célio Cezar de Moura Gomes**, meu respeito e admiração. Agradeço pelo exemplo de generosidade.

À **Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli**, pelo acolhimento, pelo convívio agradável e pela extraordinária oportunidade de partilhar pequenos encontros.

À **Dra. Lizete Malagoni** e **Dr. Paulo Maurício Oliveira**, por me acolherem num momento muito difícil.

Aos companheiros do Projeto Vigipneumo e auxiliares de pesquisa, especialmente **Roberto Dias**, **Luãine Santos**, **Karine Matsuoka**, **Lorena Peres**, **Lorena Mota**, **Nara Fukuya**, **Nathiele Costa**, **Larissa Matsuoka**, **Daniela Guimarães**, **Liege Vieira**, **Lícia Thorn**, **Thales Cavalcante**, **Gabriela Camargo**, **Raquel Pinheiro**,

Victor Brito, Livia Navara, Clarice Carvalho, Denise Soares, Yulla Fernandes, Jacqueline Rodrigues, Wilzianne Ramalho e Solimar Carvalho. Vocês foram fundamentais para a realização desse estudo. Obrigada pelo carinho e amizade de vocês.

Aos profissionais das Unidades de Cuidados Intensivos Neonatais e Pronto Atendimento pela parceria na realização desse estudo, em especial aos *pediatras e equipe de enfermagem*.

À direção do Hospital das Clínicas/UFG, representados pelo diretor geral **Dr. José Garcia Neto**, diretor técnico **Dr. Luís Arantes**, diretora de gestão de pessoas **Enf^a Alexandrina Maria Nogueira G. Adorno**, diretora de enfermagem **Enf^a Maria Alice Coelho**, pela viabilização de minha disposição para o doutorado.

À Diretora Departamento de Enfermagem, Fisioterapia e Nutrição da PUC-Goiás, **Enf^a Rosangela Montefusco**, por entender a importância deste momento em minha vida.

Às amigas **Andréia Gontijo** e **Lazieny Assunção** da PUC-Goiás, que me apoiaram e conduziram a disciplina de Pediatria na minha ausência.

Ao **Dr. Cláudio Medrado** e **Dr. Dagoberto Costa**, chefes da Divisão de Fiscalização em Estabelecimento de Saúde da Vigilância Sanitária, obrigada por confiarem em mim e compreenderem a importância do aprimoramento do conhecimento para o crescimento profissional.

Aos *professores* do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Patologia Tropical, pela atenção e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos *colegas* do mestrado, em especial aos do doutorado, aos quais tive a honra de representá-los junto à Pós-Graduação do IPTSP.

Ao **Dr. Ricardo Manzi**, da Vigilância Sanitária pelo companheirismo e pela compreensão na dificuldade em compatibilizar agendas de trabalho.

Ao **José Clementino de Oliveira Neto** (Zezinho) e **Kariny Vieira Soares**, da secretaria da Pós-Graduação do IPTSP e, à **Marina Honorato Costa**, secretária do Departamento de Saúde Coletiva do IPTSP, pela atenção e presteza.

Às minhas filhas, **Liege** e **Raísa**, quem melhor compreenderam minha ausência e que estiveram comigo em todas as etapas para concretizar o meu sonho.

Ao meu irmão **Valdir** e sua esposa **Teresa**, à minha irmã **Suêdy** e seu marido **Carlos** e, às minhas *sobrinhas*, pela amizade, união e companhia eterna.

Ao meu companheiro **Manoel** pela sua companhia paciente e por saber me esperar. Eu preciso da sua tranquilidade.

Às *crianças* do Pronto Atendimento e *recém-nascidos* incluídos nesse estudo, extensivo aos seus *familiares*, sem as quais este trabalho não poderia ser efetivado.

A todos vocês, muito obrigada!

*O valor das coisas não está no tempo
que elas duram, mas na intensidade com
que acontecem. Por isso, existem
momentos inesquecíveis, coisas
inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMÁRIO.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
PREFÁCIO.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características do <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.2 Resistência do <i>Staphylococcus aureus</i> aos agentes antimicrobianos.....	3
1.3 Bases moleculares da resistência do <i>Staphylococcus aureus</i> à metilina.....	4
1.4 Métodos moleculares de tipificação do MRSA.....	7
1.5 Classes de <i>S. aureus</i> resistentes à metilina.....	9
1.5.1 MRSA associado aos serviços de saúde (HA-MRSA).....	9
1.5.2 MRSA associado à comunidade (CA-MRSA).....	11
1.5.3 HA-MRSA vs. CA-MRSA.....	12
1.6 Epidemiologia, controle e prevenção de MRSA.....	13
1.7 O portador nasal de MRSA.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
4 MATERIAL E MÉTODO.....	21

4.1	Delineamento do estudo	21
4.2	Populações do estudo	21
4.3	Amostragem e tamanho da amostra	22
4.4	Coleta de dados e de <i>swab</i> nasal	22
4.5	Procedimentos microbiológicos	23
4.5.1	Isolamento e identificação do <i>S. aureus</i>	23
4.5.2	Testes de suscetibilidade	25
4.5.3	Tipagem molecular	26
4.6	Análise de Dados	34
4.7	Aspectos éticos.....	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Prevalência de portador de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA	37
5.2	Potenciais fatores associados ao portador de <i>S. aureus</i> e MRSA	37
5.3	Perfil de resistência antimicrobiana	42
5.4	Epidemiologia molecular das cepas MRSA.....	43
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO 1	73
	ANEXO 2	89
	ANEXO 3	93
	ANEXO 4	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bp	Pares de bases
CA-MRSA	<i>Community Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
<i>ccr</i>	<i>Cassette chromosome recombinase</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEB	Clone Epidêmico Brasileiro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPAP	<i>Continuous Positive Airway Pressure</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
Dntp	<i>Triphosphate desoxinucleotide</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
HA-MRSA	<i>Healthcare-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
IATS	Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MLS _B	<i>Macrolide-licosamide-streptogramin B</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OSPC	Oceania South Pacific Clone
PA	Pronto Atendimento
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PBP2a	<i>Penicillin-binding protein 2a</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PVL	<i>Panton-Valentine Leucocidin</i>
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SDS	<i>Dodecil Sulfato de Sódio</i>
SENTRY	<i>SENTRY Antimicrobial Surveillance Program</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
Tris HCl	<i>Tris (hydroxymethyl) Amiomethane Hydrochloride</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UCIN	Unidade de Cuidado Intensivo Neonatal
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Groups Method</i>
WA-MRSA	Western-Australia MRSA

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Esquema representativo da composição estrutural dos SCC <i>mec</i> tipos I a VIII identificados em MRSA.	6
Figura 2. Procedimento operacional padrão de isolamento e identificação do <i>S. aureus</i> .	24
Figura 3. Fluxograma do estudo.	36
Figura 4. Gráficos-caixa do tempo de internação para casos incidentes de portador nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA).	41
Figura 5. Similaridade genética de cepas MRSA de crianças de Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN) e Pronto Atendimento (PA). Características epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas de crianças de UCIN e PA (a) ; Características genotípicas e fatores de risco para MRSA de crianças atendidas em PA (b) e em UCIN (c) .	45

LISTA DE TABELAS

	pag.
Tabela 1: Distribuição e características dos principais clones de HA-MRSA.	10
Tabela 2. Distribuição dos principais clones de CA-MRSA.	12
Tabela 3. Principais características clínicas e moleculares das duas classes de <i>S. aureus</i> meticilina-resistente (HA-MRSA/CA-MRSA).	13
Tabela 4. Características das crianças estudadas. Goiânia, Goiás.	22
Tabela 5. Sequência dos inicializadores utilizados para PCR <i>multiplex</i> para a determinação dos tipos de <i>SCCmec</i> .	29
Tabela 6. Clones internacionais de MRSA utilizados para comparação dos isolados MRSA por PFGE.	31
Tabela 7. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).	33
Tabela 8. Prevalência de portador de <i>Staphylococcus aureus</i> e de MRSA de acordo com os grupos populacionais	37
Tabela 9. Potenciais fatores associados à colonização nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA ^a em crianças atendidas no serviço de Pronto Atendimento.	38
Tabela 10. Análise multivariada dos fatores de risco para colonização nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA ^a em crianças atendidas no serviço de Pronto Atendimento.	39
Tabela 11. Potenciais fatores associados à colonização nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA ^a em neonatos admitidos em Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal.	40
Tabela 12. Análise multivariada dos fatores de risco para colonização nasal de <i>S. aureus</i> em crianças admitidas nas UCINs ^a de Goiânia.	40
Tabela 13. Características clínicas e microbiológicas dos portadores nasais de MRSA internados nas Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal.	41
Tabela 14. Incidência de portador de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA ^a nas diferentes Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCINs).	42
Tabela 15. Características fenotípicas e genotípicas das cepas MRSA	43
Tabela 16. Parentesco genético entre cepas de portador nasal de MRSA isoladas de neonatos de UCINs e de crianças atendidas em serviços de pronto atendimento de Goiânia.	46

PREFÁCIO

Este estudo integra a linha de pesquisa de infecções bacterianas na morbimortalidade na infância, que vem sendo conduzida por pesquisadores do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) com o objetivo de melhor compreender a colonização nasal por *S. aureus* e MRSA em uma população pediátrica vulnerável.

Esta tese está apresentada no formato tradicional de tese e trata-se de uma investigação sobre a prevalência e fatores de risco do portador nasal, além das características moleculares de *S. aureus* e de MRSA isolados, tanto de crianças atendidas em Pronto Atendimento, quanto das admitidas em Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal de Goiânia (UCINs). A tese é acompanhada por um artigo de revisão sistemática intitulada *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carriage in neonatal intensive care units: a global systematic review* (anexo 1).

RESUMO

Introdução: Portador nasal de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) é um preditor de infecção subsequente. Portadores de MRSA são um reservatório oculto, emergente na comunidade e nos serviços de saúde. Os objetivos deste estudo foram avaliar a prevalência e fatores de risco do portador nasal por *S. aureus* e MRSA em crianças atendidas em Pronto Atendimento (PA) e admitidas em Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCINs) e descrever as características moleculares de tais isolados. **Método:** Swabs nasais foram obtidos de crianças menores de 60 meses atendidas em PA e de neonatos de quatro UCINs do município de Goiânia, Brasil, em 2007 e 2008. A definição de MRSA seguiu critérios definidos pelo CLSI. Variáveis de exposição para portadores de *S. aureus* e MRSA foram obtidas por meio de entrevistas com mães e registros hospitalares. Regressão logística multivariada foram realizadas para identificar fatores de risco. A tipagem molecular foi feita por meio de staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e seqüenciamento de multilocus enzimáticos (MLST). **Resultados:** Um total de 2.735 crianças foi recrutado. No PA (n=2.034), as prevalências de portador nasal para *S. aureus* e MRSA foram de 20,1% (n=408) e de 0,2% (n=4), respectivamente. Nas UCINs (n= 701), a prevalência de portador nasal variou de 0,03% a 15,7% para *S. aureus* (n=64) e, de 0,0% a 2,0% para MRSA (n=4). No PA, o portador de MRSA foi independentemente associado à frequência de creche nos últimos 6 meses (OR=10,6; p=0,045) e malformação congênita (OR=26,8; p=0,002). Todos os portadores nasais de MRSA nas UCINs eram crianças internadas em hospitais privados e a única variável associada ao portador MRSA foi tempo de internação (p=0,023). Das quatro crianças portadores de MRSA no PA, uma portava SCC*mec* tipo III e, três, SCC*mec* tipo IV. Nas UCINs, duas crianças eram SCC*mec* tipo III e duas, SCC*mec* tipo IV. Todas as cepas SCC*mec* tipo III eram multidrogarresistentes (CLSI). Cepas MRSA relacionadas ao clones pediátrico/USA800 e epidêmico brasileiro foram detectados no PA e nas UCINs. Um cluster MRSA relacionado ao clone Western Australia/WA-1/USA400 foi encontrado no PA. **Conclusão:** Crianças atendidas no pronto atendimento, especialmente aquelas que freqüentaram creche, e neonatos de UCINs apresentam potencial para disseminação de MRSA nos serviços de saúde. O estudo sugere transmissão cruzada de MRSA SCC*mec* tipo III e tipo IV entre serviços de emergência e hospitais.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina; portador nasal; criança; epidemiologia molecular; unidades de terapia intensiva neonatal; serviços de emergência; fatores de risco; similaridade genética.

ABSTRACT

Background: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA) is known to be a risk for subsequent infection. The MRSA carriers are an emergent and hidden reservoir in community and in the health-care environment. The aim of this investigation were to assess the prevalence and risk factors for MRSA nasal carriage in children attending emergency departments (ED) and Neonatal Intensive Care Units (NICU), and to describe the molecular features of such isolates. **Methods:** Nasal *swabs* were obtained from children less than 60 months of age attending ED, and from newborns of the four NICUs of Goiânia city, central Brazil, in 2007 and 2008. The definition of MRSA followed the CLSI criteria. Exposure variables to *S. aureus* and MRSA carriers were gathered through in-person interviews with mothers and hospital records. Univariate and multivariate logistic regression were performed to identify risk factors for *S. aureus* and MRSA carriage. Molecular typing was evaluated by pulsed field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, and multilocus sequence type (MLST). **Results:** A total of 2,735 children were enrolled. At the ED (n=2.034), the prevalence respectively of nasal carriage for *S. aureus* and MRSA were 20% (n=408) and 0.2% (n=4). Among NICUs (total of infants = 701), the prevalence of nasal carriage ranged from 0.03% to 15.7% for *S. aureus* and, from 0.0% to 2.0% for MRSA. At the ED, MRSA carriage was independently associated with child-care attendance in the previous 6 months (OR=10.6; p=0.045) and congenital malformation (OR=26.8; p=0.002). All nasal carriers at NICUs were from private hospitals. Only length of hospitalization was associated with MRSA nasal carriage at NICUs (p=0.023). Among four MRSA nasal carrier at ED, one harbored SCC*mec* type III, and three SCC*mec* type IV. Among four children from at the NICUs two infants harbored SCC*mec* type III, and two SCC*mec* type IV. All MRSA-SCC*mec* type III were multidrug-resistant. Strains related to Pediatric/USA800 and Brazilian MRSA clones were detected in both, ED and NICUs. One MRSA cluster related to Western Australia/USA400 was detected in ED. **Conclusions:** Children visiting ED, especially those reporting day-care attendance, and neonates from NICUs may play a role in spreading MRSA in healthcare settings. The study suggests cross transmission of MRSA type III and type IV between ED and hospital environments.

Key words: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; nasal carriage; children; molecular epidemiology; neonatal intensive care units; emergency department; risk factors; genetic similarity.

1 INTRODUÇÃO

O acentuado declínio no número de mortes de recém-nascidos e crianças no mundo constitui uma das maiores histórias de sucesso da saúde pública mundial. Recentemente, uma análise sobre mortalidade infantil em 187 países mostra que o número de mortes em crianças menores de cinco anos caiu de 16 milhões em 1970 para 7,7 milhões em 2010 (Rajaratnam *et al.*, 2010). Nas últimas décadas os rápidos avanços científicos no atendimento neonatal, possibilitaram maior sobrevivência de prematuros e recém-nascidos (Mulholland *et al.*, 2008). O risco de mortes para crianças menores de cinco anos foi projetado para reduzir em quase 25% entre os anos 2005 e 2015 (Mathers e Loncar, 2006; Lawn *et al.*, 2007). Apesar desses progressos, o mundo ainda não tem condições de alcançar o Objetivo de Desenvolvimento do Milênio de reduzir em dois terços a taxa de mortalidade infantil até o ano de 2015 (United Nations, 2000; Lawn *et al.*, 2007), uma vez que nos países em desenvolvimento, o declínio da mortalidade em crianças menores de cinco anos é inferior à meta estabelecida (Rajaratnam *et al.*, 2010). Desde a descoberta dos antibióticos, infecções letais transformaram-se em doenças tratáveis. Todavia, as infecções bacterianas ainda são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade infantil (Lawn *et al.*, 2008).

Atualmente, o *Staphylococcus aureus* destaca-se como o patógeno responsável por uma grande variedade de infecções, desde as leves até aquelas envolvendo elevada mortalidade (Biedenbach *et al.*, 2004; Crawford e Daum, 2005; Blomberg *et al.*, 2007). Durante o século XX, o uso e o abuso de antibióticos, associados à produção de novos antimicrobianos, favoreceram o aparecimento de microrganismos resistentes. Essa resistência a antimicrobianos trouxe uma nova preocupação relacionada ao manejo das infecções. A emergência da resistência antimicrobiana também é agravada pela capacidade do *S. aureus* se disseminar rapidamente no mundo globalizado e dentro de hospitais (Grundmann *et al.*, 2006). Essa ameaça à saúde pública provocou uma frágil reação dos consumidores, gestores e profissionais de saúde, que pode ser devida à carência de dados de morbimortalidade atribuível à resistência antimicrobiana (Cars *et al.*, 2008).

1.1 Características do *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, são cocos Gram-positivos da família *Micrococcaceae* (Brooks *et al.*, 2000), que é composta por cerca de 40 espécies, das quais 17 subespécies podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Em meios sólidos, as colônias de *S. aureus* são bem definidas, convexas, lisas e com 6 a 8 mm de diâmetro. O nome *S. aureus* foi introduzido por Alexandre Ogston em 1883, para descrever um grupo de micrococos causadores de inflamação e supuração (Kloss, 1997; Bannerman, 2003).

O *S. aureus* faz parte da flora humana normal, colonizando a narina anterior, períneo e pele (Chambers, 2001). Quando em um hospedeiro, o *S. aureus* pode produzir manifestações clínicas ou pode permanecer assintomático (portador) e, somente métodos laboratoriais podem identificá-lo. A maioria das cepas de *S. aureus* é oportunista e pode colonizar indivíduos de todas as faixas etárias, principalmente crianças com idade inferior a cinco anos, sem sintomatologia, por períodos curtos ou longos (Melish e Campbell, 1998). As infecções causadas por *S. aureus* são usualmente cutâneas e subcutâneas, podendo se disseminar por via sangüínea para sítios distantes e causar infecções mais graves como endocardite, osteomielite e abscesso (Moran *et al.*, 2006).

Na infância, a relevância do *S. aureus* em saúde pública deve-se às altas taxas de morbidade e mortalidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Healy *et al.*, 2004). Na era pré-antibiótica, a mortalidade por *S. aureus* chegou a 80% (Skinner e Keefer, 1941). A eficiência da disseminação de *S. aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade desse microrganismo em colonizar homem e ambiente e em adaptar-se rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, deficiência de nutrientes (Cepeda *et al.*, 2005).

A importância do *S. aureus* também reside na combinação da virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antimicrobianos (Le Loir *et al.*, 2003). Os fatores de virulência que incluem as hemolisinas, a leucocidina e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos. A toxina 1 responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (EEs), que causam a intoxicação alimentar estafilocócica, formam o grupo de superantígeno (Bannerman, 2003). Até a década de 80, o *S. aureus* era considerado a única espécie coagulase positiva, sendo o resultado do teste da coagulase definitivo para a identificação dessa espécie.

Posteriormente foram isoladas, a partir de infecções humanas e animais, as espécies *S. Schleiferi* (May *et al.*, 2005), *S. hyicus* (Wegener *et al.*, 1994) e *S. intermedius* (Petersen *et al.*, 2002), que também são produtoras de coagulase. A confirmação da espécie se faz por provas bioquímicas, como a catalase e a coagulase, sendo esta última utilizada para diferenciar os *S. aureus* dos demais membros do gênero *Staphylococcus*, que são incapazes de promover a coagulação do plasma sanguíneo.

1.2 Resistência do *Staphylococcus aureus* aos agentes antimicrobianos

Os estafilococos são bactérias que historicamente vêm escapando à ação dos antimicrobianos, pela capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes. A introdução da benzilpenicilina em 1944 foi acompanhada pelo aparecimento de cepas de estafilococos produtoras de betalactamase (Kirby, 1944). O mecanismo de ação da penicilina se deve à união desse fármaco à proteína de ligação (PBP- *Penicilin Binding Protein*) da bactéria, que tem alta afinidade por antibióticos β -lactâmicos, e atua nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias. Cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina possuem quatro tipos de PBPs (Lim e Strynadka, 2002) e se tornaram resistentes aos compostos β -lactâmicos pela síntese de uma proteína adicional, PBP2a ou PBP2', codificada pelo gene *mecA*. Essa nova proteína substitui as funções essenciais das PBPs, permitindo que a célula sobreviva em concentrações de antibióticos letais em outras condições. Esse mecanismo de resistência é denominado “via alternativa para a síntese de peptideoglicano” (Brumfitt e Hamilton-Miller, 1989; Chambers, 1997).

Posteriormente, na década de 60, penicilinas semi-sintéticas estáveis às betalactamases, como a meticilina e oxacilina começaram a ser utilizadas e cepas de *S. aureus* resistentes a estas penicilinas surgiram quase imediatamente. Elas foram denominadas *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes e identificadas com a sigla MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). As primeiras cepas MRSA surgiram no Reino Unido, na década de 60 (Jevons, 1961). No Brasil, apesar de não se utilizar a meticilina para tratamento de infecção por *S. aureus*, e sim a oxacilina, a expressão “meticilina-resistente” é empregada para designar as cepas de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com oxacilina.

Atualmente, a determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* a concentrações conhecidas de antimicrobianos deve ser realizada de acordo com recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* dos Estados Unidos da América, CLSI (2007), reconhecido como padrão internacional. Os antimicrobianos recomendados para o antibiograma para *S. aureus* são: oxacilina, penicilina, azitromicina ou claritromicina ou eritromicina, cefalosporinas de primeira geração, quinolonas, teicoplanina, clindamicina; daptomicina; linezolida; telitromicina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina. O CLSI estabeleceu como estafilococo sensível (MSSA) e resistente (MRSA) aqueles cujo crescimento é inibido por concentrações de oxacilina ≤ 2 e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Um grupo importante de antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por *S. aureus* é o complexo MLS_B , que inclui macrolídeos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) e esteptogramina B (Jorgensen *et al.*, 2004). A clindamicina é o antimicrobiano de escolha para o tratamento das infecções de pele e tecidos moles causadas por estafilococos, em especial MRSA. É ainda o tratamento alternativo para crianças alérgicas à penicilina (Drinkovic *et al.*, 2001). A elevada capacidade do *S. aureus* de gerar resistência aos antimicrobianos pode ser observada pela resistência constitutiva e induzida ao grupo MLS_B (Schreckenberger *et al.*, 2004). A resistência constitutiva apresenta resistência a todos antibióticos MLS_B e a resistência induzida expressa resistência aos macrolídeos (Azap *et al.*, 2005). A detecção dessa resistência pode ser feita pelo teste D (CLSI, 2007), que consiste na aproximação do disco de eritromicina e clindamicina. Se houver resistência induzível ao grupo MLS_B , haverá um achatamento da zona próxima ao disco de clindamicina, em formato de “D” (O'Sullivan *et al.*, 2006).

O uso intensivo e indiscriminado de antimicrobianos são algumas das razões para impulsionar a pressão seletiva de cepas resistentes, limitando as opções terapêuticas e favorecendo a disseminação dos MRSA associados aos serviços de saúde (HA-MRSA) e, mais recentemente, dos MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) (Cars *et al.*, 2008).

1.3 Bases moleculares da resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina

A base molecular da resistência à meticilina é determinada pela aquisição do gene *mecA*. O gene *mecA* é um segmento de DNA exógeno, ou seja, não nativo nos *S. aureus*.

Os estudos sugerem que cepas MRSA adquiriram o elemento *mec* de estafilococos coagulase-negativo e que se encontra inserido em um bloco de DNA, conhecido como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec* - *staphylococcal cassette chromosome mec*) (Katayama *et al.*, 2000; Petinaki *et al.*, 2001; Hiramatsu *et al.*, 2002; Oliveira e de Lencastre, 2002). O elemento SCC*mec* é composto por três elementos genéticos essenciais: (i) o complexo gênico *mec*; (ii) o complexo gênico *ccr* (*cassette chromosome recombinase*), que codifica recombinases responsáveis pela sua mobilidade e, (iii) a região J (*junkyard*) que codifica resistência para antibióticos não β-lactâmicos e metais pesados.

Atualmente foram descritos oito principais tipos de SCC*mec*, designados de I a VIII e variam de acordo com as combinações das classes do complexo gênico *mec* e do alótipo de *ccr*. A **Figura 1** apresenta um esquema da composição estrutural dos SCC*mec* tipos I a VIII identificados em MRSA.

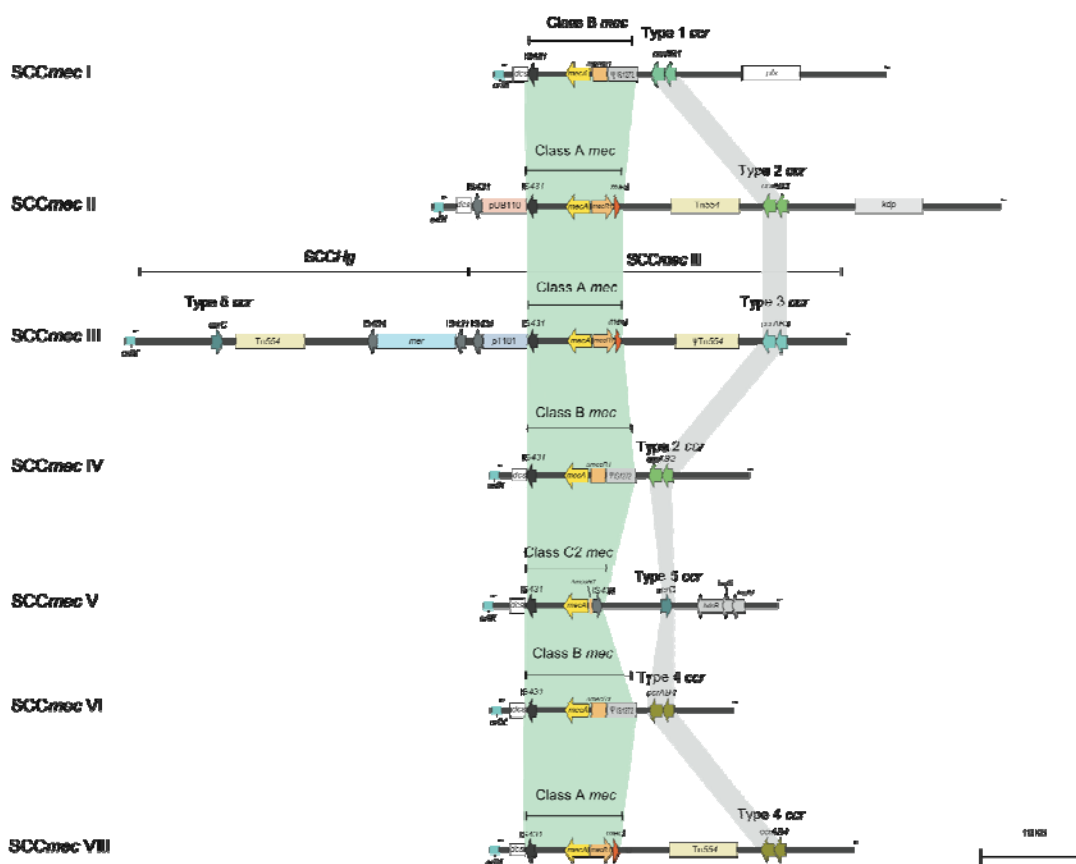


Figura 1. Esquema representativo da composição estrutural dos SCC*mec* tipos I a VIII identificados em MRSA. Adaptado de Chen *et al.* (2009).

Os tipos de SCC*mec* ainda possuem as seguintes características:

- SCC*mec* tipo I → (34,3 kb, classe B do complexo do gene *mec* e *ccrAB1*) primeiro MRSA identificado em 1961, no Reino Unido; não contém nenhum gene de resistência, exceto o *mecA*.
- SCC*mec* tipo II → (53,0 kb, classe A do complexo do gene *mec* e *ccrAB2*) identificado em 1982, no Japão; carregam múltiplos genes de resistência.
- SCC*mec* tipo III → (66,9 kb, classe A do complexo do gene *mec* e *ccrAB3*) descrito em 1985, na cepa MRSA isolada na Nova Zelândia; carregam múltiplos genes de resistência.
- SCC*mec* tipo IV → (20,9-24,3 kb, classe B do complexo do gene *mec* e *ccrAB2*) identificado em cepas MRSA isoladas no começo da década de 90 de infecções comunitárias na Austrália; não apresenta nenhum gene de resistência além do *mecA* e possui uma nova combinação dos complexos *ccr* e *mec*.
- SCC*mec* tipo V → (28 kb, classe C2 do complexo do gene *mec* e *ccrC*) descrito em 2004, na cepa comunitária WIS da Austrália;
- SCC*mec* tipo VI → (20,9 Kb, classe C2 do complexo do gene *mec* e *ccrAB4*) identificado em 2006, em Portugal;
- SCC*mec* tipo VII → (35,9 kb) descrito em 2008 em Taiwan;
- SCC*mec* tipo VIII → (32 kb) recentemente descrito no Canadá em 2009.

Além da classificação dos tipos de SCC*mec*, foram descritos alguns clones MRSA altamente epidêmicos no mundo com o auxílio de técnicas moleculares (Oliveira *et al.*, 2001). Essas linhagens clonais de MRSA são: (i) Ibérico, ST247-IA, relatado pela primeira vez em 1989 como o clone dominante em um grande surto em um hospital da Espanha (Dominguez *et al.*, 1994); (ii) Brasileiro/Húngaro, ST239-III/IIIA; (iii) Pediátrico, ST5-IV/VI; (iv) Nova Iorque/Japão, ST5-II, geneticamente relacionado ao clone pediátrico (Aires de Sousa *et al.*, 2000); (v) EMRSA-15, ST22-IV; (vi) EMRSA-16, ST36-II; e, (vii) Berlim, ST45-IV.

Com o objetivo de unificar uma base de dados molecular, pesquisadores do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) compararam amostras de cepas MRSA coletadas nos Estados Unidos e em outros países, utilizando padrões de PFGE com mais de 80% de similaridade e os reclassificaram em oito padrões denominados USA 100 a 800 (McDougal *et al.*, 2003). Os clones mundiais que faziam parte da coleção dos isolados

analisados receberam a seguinte nomenclatura: clone USA100 (Nova Iorque/Japão), USA200 (E-MRSA-16), USA500 (clone ibérico), USA800 (clone pediátrico). O clone brasileiro não foi encontrado nesta coleção, não sendo, portanto, reclassificado.

1.4 Métodos moleculares de tipificação do MRSA

Para melhor compreensão da epidemiologia do MRSA, algumas ferramentas de identificação têm sido aplicadas na tipagem desse microrganismo. A identificação de MRSA é realizada por métodos fenotípicos e confirmada por testes moleculares.

A expressão fenotípica de resistência à meticilina é freqüentemente heterogênea, uma vez que pode ser influenciada pelas condições de cultivo, pH, temperatura e concentração de NaCl do meio. Assim, os métodos fenotípicos como antibiograma, biotipagem e fagotipagem apresentam uma instabilidade maior do que os resultados das técnicas moleculares, apresentando algumas limitações em seu poder discriminatório (Tenover *et al.*, 1997).

Os métodos moleculares permitem diferenciar isolados com fenótipos idênticos e têm sido empregados como importante ferramenta da epidemiologia molecular para estabelecer rotas de disseminação e estabelecer relações evolucionárias entre os isolados (Oliveira e de Lencastre, 2002). Atualmente, os principais métodos moleculares utilizados para caracterizar as cepas MRSA incluem:

1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar um segmento de DNA a partir de uma única molécula, com formação de vários fragmentos visualizados pela eletroforese em gel de agarose. A detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR é considerada o método ideal para a discriminação das linhagens de SCC*mec* (Milheirico *et al.*, 2007; Stratidis *et al.*, 2007);

2. Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) proporciona excelente reprodutibilidade. É considerado o padrão ouro para avaliação de similaridade genética pelo elevado poder discriminatório. PFGE é o método mais utilizado para estudar a epidemiologia local do *S. aureus* e em investigações de surtos (Cookson *et al.*, 2007). Os avanços na padronização da eletroforese e no desenvolvimento

de software para análise da normalização das bandas permitiram o uso do PFGE em estudos multicêntricos (Chung *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Duck *et al.*, 2003).

3. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método de tipagem bacteriana que auxilia na caracterização de um clone em uma população de cepas MRSA e vem sendo valorizado em estudos epidemiológicos e de evolução do *S. aureus* (Enright *et al.*, 2000; Enright *et al.*, 2002). Amplifica e sequencia uma região de cerca de 450 pb de sete genes essenciais que codificam enzimas conservadas dos *S. aureus* (*housekeeping genes*). As diferentes seqüências de genes são assinaladas como alelos distintos e, os isolados são caracterizados pelos alelos de cada uma das sete regiões conservadas (perfil alélico ou ST). Isolados com os sete alelos semelhantes são relacionados a um complexo clonal (CC), destacando-se seis linhagens: CC1 CC8, CC5, CC30, CC45, e CC22 (Enright *et al.*, 2000).

4. *Spa-typing* é um método proposto para realizar uma seqüência rápida para caracterização de MRSA. Possui alta portabilidade, discriminação e facilidade de utilização (Shopsin *et al.*, 2000). Consiste na análise da seqüência do DNA da região polimórfica repetida do gene da proteína A do *S. aureus* (*spa*) (Cookson *et al.*, 2007).

O *spa typing* fornece dados concordantes com o MLST e PFGE, mas não descarta a necessidade de uma análise do *SCCmec* para determinar a designação clonal de um isolado. Enquanto o *spa type* envolve uma única região do cromossomo, sujeita à recombinação entre clones independentes, o PFGE e o MLST investigam várias regiões do cromossomo. Em conjunto, PFGE e MLST representam dois extremos na análise da diversidade genética: o MLST captura a estrutura populacional em grande escala de uma espécie, mas é incapaz de discriminar os isolados proximalmente relacionados, ao contrário do PFGE, que é o padrão ouro para essa discriminação. O *spa typing*, representa uma abordagem intermediária para análise de micro e macrovariações (Shopsin *et al.*, 2000; Harmsen *et al.*, 2003; Cookson *et al.*, 2007). Resultados de MLST e *spa typing* podem ser comparados com dados de bancos de dados internacionais (<http://www.mlst.net> e <http://www.ridom.de/spaserver>). Nesses bancos de dados, as seqüências de DNA podem ser armazenadas com a informação clínica correspondente de cada isolado, o que permite obter o perfil alélico e estabelecer relações filogenéticas de ancestralidade dos principais clones MRSA (Aires-de-Sousa *et al.*, 2006; Cookson *et al.*, 2007).

1.5 *Classes de S. aureus resistentes à meticilina*

Durante muitos anos as infecções causadas por MRSA foram documentadas apenas em serviços de saúde (*healthcare-associated methicillin-resistant S. aureus* - HA-MRSA), mas nos últimos anos, emergiram cepas MRSA associadas à comunidade conhecidas como *community-associated methicillin-resistant S. aureus* (CA-MRSA).

1.5.1 MRSA associado aos serviços de saúde (HA-MRSA)

As infecções por HA-MRSA são aquelas que ocorrem após hospitalização por um período superior a 48 horas, em indivíduos em terapia intravenosa ambulatorial, ou em pacientes com recente atendimento hospitalar, hemodiálise ou serviços de cuidados prolongados (Klevens *et al.*, 2006). Outro critério de definição usado é o que discrimina HA-MRSA por meio de métodos moleculares de tipificação (McDougal *et al.*, 2003).

A maioria dos HA-MRSA tem sido associados com os SCC*mec* tipo I, II e III (Oliveira e de Lencastre, 2002) com elevada multi-droga resistência (Deresinski, 2005). Dentre as implicações da multirresistência estão o uso de antibióticos menos eficazes e aumento dos custos do tratamento (de Miranda *et al.*, 2007). Alguns clones HA-MRSA são responsáveis pela maioria das infecções relacionadas aos serviços de saúde (Grundmann *et al.*, 2006). A **tabela 1** mostra a distribuição e características dos principais clones HA-MRSA.

O clone Nova Iorque/Japão, também chamado USA100 e inicialmente considerado o clone MRSA predominante em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque, foi posteriormente identificado no Japão (Aires de Sousa *et al.*, 2000). Ainda é o principal clone de infecção por HA-MRSA nos Estados Unidos (McDougal *et al.*, 2003) e bastante freqüente em hospitais brasileiros (Melo *et al.*, 2004; de Miranda *et al.*, 2007).

O clone pediátrico ou USA800 é encontrado nos serviços de saúde (Aires de Sousa *et al.*, 2005; Dauwalder *et al.*, 2008). Foi identificado nos hospitais de Portugal na segunda metade da década de 1990 (Sa-Leao *et al.*, 1999), mas sua origem ainda não foi determinada (Aires de Sousa *et al.*, 2005). Posteriormente este clone foi documentado em hospitais de outros países e do Brasil (Melo *et al.*, 2004; de Miranda *et al.*, 2007; Andrade,

2008; Deurenberg e Stobberingh, 2009; Schuenck *et al.*, 2009; Sousa-Junior *et al.*, 2009). Apesar de o SCCmecIV ser associado predominantemente ao MRSA comunitário, o clone pediátrico do MRSA apresenta o SCCmec tipo IV, mas também pode albergar o SCCmec tipo VI (Oliveira *et al.*, 2006). O clone pediátrico, diferentemente das outras cepas SCCmec IV, não produz o fator PVL (Boyle-Vavra e Daum, 2007).

Tabela 1: Distribuição e características dos principais clones de HA-MRSA.

HA-MRSA	SCCmec ^a	ST ^b	MLST ^c	spa type	Distribuição Geográfica ^d
Arcaico	I	250	3-3-1-1-4-4-16	t008, t009, t194	Aus Can Din Ale Sui Uga UK US
Berlim (USA 600)	IV	45	10-14-8-6-10-3-2	t004, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390	Arm Ast Aus bel Chn Din Fin Alm Hun Isr Hol Nor Spa Sui US
Brasileiro/ Húngaro	III	239	2-3-1-1-4-4-3	t030, t037, t234, t387, t388	Alg Arg Ast Aus Bra Can Chi Chn Tch Din Fin Ale Gre Hun Ind Ids Irl Kor Mon Hol Nor Par Pol Por AS Sin Slo Esp Sri Sui Tai Tha UK Uru US Vie
Ibérico	I	247	3-3-1-12-4-4-16	t008, t051, t052, t054, t200	Aus Bel Cro Tch Din Fin Fra Ale Hun Isr Ita Hol Nor Pol Slo Esp Sue Sui UK US
Irlandês	II	8	3-3-1-1-4-4-3	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Ast Can Irl UK US
Nova Iorque/ Japão (USA 100)	II	5	1-4-1-4-12-1-10	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Ast Bel Can Chn Din Fin Fra Ale Hun Ire Isr Jap Kor Mex Nor Por AS Sin Sue Sui Tai Uru UKA US
Pediátrico (USA 800)	IV	5	1-4-1-4-12-1-10	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alg Arg Aus Bra Col Cor Din Fin Fra Nor Pol Por Spa Sue Uru UK US
Alemão	I	5	1-4-1-4-12-24-29	t001, t023, t041, t188, t201	Aus Bel Din Fin Ale Hun Ita Slo Esp Sui.
UK EMRSA-21-6 (USA 500)	I	8	1-4-1-4-12-1-10	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Ast Aus Bel Can Din Fin Fra Ale Hun Irl Isr Hol Nor Tai UK US
UK EMRSA-3	I	5	1-4-1-4-12-1-10	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Arg Din Nor Par Slo Tai UK
UK EMRSA-15	IV	22	7-6-1-5-8-8-6	t005, t022, t032, t223, t309, t310, t417, t420	Ast Aus Bel Can Chn Tch Din Fin Ale Hun Irl Kuw NZ Nor Por Sin Esp SueUK
UK EMRSA-16 (USA 200)	II	36	2-2-2-2-3-3-2	t018, t253, t418, t419	Ast Aus Bel Can Din Fin Gre Irl Mex Nor Por Sue Sui UK US

Adaptado de Deurenberg & Stobberingh, 2009.

^a SCCmec, Staphylococcal Cassette Chromosome mec

^b ST, sequence type.

^c MLST, Multilocus Sequence Typing.

^d Ale: Alemanha; Alg: Argélia; Arg: Argentina; Arm: Armênia; AS: Arábia Saudita; Ast: Austrália; Aus: Áustria; Bel: Bélgica; Bra: Brasil; Can: Canadá; Chi: Chile; Chn: China; Cor: Coreia; Col: Colômbia; Cro: Croácia; Din: Dinamarca; Esp: Espanha; US: Estados Unidos; Fin: Finlândia; Fra: França; Gre: Grécia; Hol: Holanda; Hun: Hungria; Ind: Índia; Ids: Indonésia; Irl: Irlanda; Isr: Israel; Ita: Itália; Jap: Japão; Kuw: Kuwait; Mex: México; Mon: Mongólia; NZ: Nova Zelândia; Nor: Noruega; Par: Paraguai; Pol: Polónia; Por: Portugal; Sin: Singapura; Slo: Slovênia; Sri: Sri Lanka; Sue: Suécia; Sui: Suíça; Tai: Taiwan; Tha: Tailândia; Uga: Uganda; UK: Reino Unido; Uru: Uruguai; Vie: Vietnam.

No Brasil foi descrito, em 1992, o clone epidêmico brasileiro (Sader *et al.*, 1994). Encontrado de Norte a Sul, é o responsável pela maioria das infecções nos serviços de saúde (Teixeira *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2001; Guilarde *et al.*, 2006; Andrade, 2008; Sousa-Junior *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2009). Este clone encontra-se disseminado por várias regiões do mundo, incluindo países da América Latina e Europa (Aires De Sousa *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Deurenberg e Stobberingh, 2009).

1.5.2 MRSA associado à comunidade (CA-MRSA)

Infecções por cepas CA-MRSA emergiram em adultos e crianças saudáveis, sem fatores de risco predisponentes (Herold *et al.*, 1998; Fergie e Purcell, 2001; Deurenberg e Stobberingh, 2009; Ozaki *et al.*, 2009). Os primeiros relatos de MRSA comunitário ocorreram em aborígenes da Austrália (Udo *et al.*, 1993), mas uma preocupação global surgiu em 1999, com quatro casos fatais de crianças norte-americanas (CDC, 1999).

Não há um critério claro para a definição de CA-MRSA (Salgado *et al.*, 2003; Deurenberg e Stobberingh, 2009). Isto se deve ao fato de a definição obedecer a critérios epidemiológicos, baseados em fatores de risco, informações clínicas ou em características laboratoriais (Kluytmans-Vandenbergh e Kluytmans, 2006). A definição baseada apenas na presença de fatores de risco pode subestimar o peso de CA-MRSA (Song, 2009).

CA-MRSA é definido pelo CDC (2003) como aquele isolado em até 48 horas após a hospitalização e sem história de infecção ou colonização por MRSA, internação ou procedimento cirúrgico no último ano, admissão em casas de saúde, diálise ou ainda dispositivos intravenosos. O CA-MRSA também é definido por marcadores genéticos, como o gene SCC*mec* (tipos IV e V) (Ma *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004), ou a toxina de Panton-Valentine leucocidina (*Panton-Valentine Leukocidin* - PVL) - toxina *S. aureus* específica com potencial para lise de leucócitos (Naimi *et al.*, 2003; Tristan *et al.*, 2007). Entretanto, existe controvérsia quanto a se utilizar a toxina PVL como marcador genético para CA-MRSA (Deurenberg e Stobberingh, 2009), desde que alguns estudos encontraram baixa prevalência de PVL entre os casos de CA-MRSA (Boyle-Vavra e Daum, 2007; Park *et al.*, 2007). Atualmente, têm sido identificados diversos clones CA-MRSA (**tabela 2**).

No final do século passado, observou-se uma mudança epidemiológica importante de CA-MRSA: a prevalência de infecções em crianças saudáveis aumentou drasticamente (Herold *et al.*, 1998; Hussain *et al.*, 2000). Embora a prevalência mundial de CA-MRSA ainda seja baixa, estudos recentes indicam que as taxas estão aumentando (Chambers, 2001; Salgado *et al.*, 2003).

No Brasil, foram relatados os primeiros casos de infecções por CA-MRSA em pacientes com bacteremia em hospitais do Rio Grande do Sul, pertencentes ao clone

australiano, conhecido como OSPC (Ribeiro *et al.*, 2005). Desde então, outros estudos identificaram CA-MRSA carreadores de SCCmec tipo IV disseminados em outras instituições brasileiras (Ribeiro *et al.*, 2007; Schuenck *et al.*, 2009). Recentemente, foi documentada a primeira descrição de pneumonia necrotizante, devido ao CA-MRSA no Brasil (Scribel *et al.*, 2009). A presença de outros clones CA-MRSA identificados no Brasil, foram relacionados geneticamente às linhagens USA300 e ao WA-MRSA (do inglês: *Western Australia* MRSA ou WA-1), também denominado USA400 (Ribeiro *et al.*, 2007; Schuenck *et al.*, 2009). O clone WA-1 relatado primeiramente na Austrália em 1993 (Udo *et al.*, 1993), apresenta SCCmec IV, ST-1 e não carrega os genes que codificam PVL.

Tabela 2. Distribuição dos principais clones de CA-MRSA.

CA-MRSA	SCCmec ^a	ST ^b	MLST ^c	spa type	Distribuição Geográfica ^d
Europeu	IV	80	1-3-1-14-11-51-10	t044, t131, t376, t416, t436, t455, t1109	Alg Aus Ale Bel Bul Cro Din Esp Fin Fra Gre Hol Irl Lib Nor Rom Sin Slo Swe Swi UK Yug
Sudoeste do Pacífico (USA 1100)	IV	30	2-2-2-2-6-3-2	t012, t018, t019, t021, t038, t268, t276, t318, t338, t391	Ast Ale Aus Bel Bra Chn Din Esp Egy US Fin Hol Irl Jap Let Nor NZ Rus Sin Sue Sui UK Uru
USA 400 (Western Australia / WA-1)	IV	1	1-1-1-1-1-1-1	t127, t128, t174, t176, t386, t558	Ast Can US Fin Fra Sin Sui Uru
USA 300	IV	8	3-3-1-1-4-4-3	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Ast Ale Aus Bel Bul. Can Chn Din Esp US Fra Gre Hol Irl Kor Nor Sui UK
USA 1000	IV ou VII	59	19-23-15-2-19-20-15	t199, t216, t444	Ale Ast Chn US Fra Hol Nor Sin Tai

Adaptado de Deurenberg & Stobbering, 2009.

^aSCCmec, Staphylococcal Cassette Chromosome mec

^bST, sequence type.

^cMLST, *Multilocus Sequence Typing*.

^dAlg: Argélia, Ale: Alemanha, Aus: Austrália, Ast: Austrália, Bel: Bélgica, Bra: Brasil, Bul: Bulgária, Can: Canadá, Cor: Coreia, Chn: China, Cro: Croácia, Din: Dinamarca, Esp: Espanha, Egy: Egito, US: Estados Unidos, Fin: Finlândia, Fra: França, Gre: Grécia, Hol: Holanda, Irl: Irlanda, Jap: Japão, Let: Letônia, Lib: Líbia, Nor: Noruega, NZ: Nova Zelândia, UK: Reino Unido, Rom: Romênia, Rus: Rússia, Sin: Singapura, Sue: Suécia, Sui: Suíça, Tai: Taiwan, Uru: Uruguai, Yug: Iugoslávia.

1.5.3 HA-MRSA vs. CA-MRSA

A **tabela 3** mostra as diferenças entre as classes de MRSA (CA-MRSA e HA-MRSA) com suas características clínicas e moleculares.

Em contraste com as cepas HA-MRSA, as cepas CA-MRSA são sensíveis à maioria de classes de antimicrobianos, exceto aos β-lactâmicos. CA-MRSA são mais comparáveis à *S. aureus* meticilina-sensível (MSSA) do que HA-MRSA (Fergie e Purcell, 2001), mas podem ser mais virulentos que os HA-MRSA devido à frequente produção de PVL (Wannet *et al.*, 2004; Wannet *et al.*, 2005).

Tabela 3. Principais características clínicas e moleculares das duas classes de *S. aureus* meticilina-resistente (HA-MRSA/CA-MRSA).

<i>Características</i>	<i>HA-MRSA</i>	<i>CA-MRSA</i>
Resistência a antimicrobianos	multi-droga resistente	resistente aos β -lactâmicos
Exposição a cuidados de saúde	mais freqüente	menos freqüente
Marcadores moleculares	SCCmec I-III < 5% PVL +	SCCmec VI, V > 95% PVL +
População atingida	idosos, pré-termos, imunocomprometidos	jovens saudáveis, atletas, usuários de drogas, detentos, militares
Clínica	invasivo, infecção cirúrgica	infecção de pele e tecidos moles, raramente invasivo, recorrente
Fatores de risco	dispositivos invasivos, hospitalização prolongada, uso prolongado de antimicrobiano	contato físico, higiene precária, lesão de pele

Adaptado de Millar *et al.* (2007) e Matouskova e Janout (2008).

1.6 *Epidemiologia, controle e prevenção de MRSA*

Um forte interesse sobre MRSA, tanto científico quanto público, ocorreu após publicação de uma estimativa de 18.650 mortes de pessoas infectadas em 2005 nos Estados Unidos (Klevens *et al.*, 2007). As infecções causadas pelo MRSA foram então rotuladas pela mídia como “the hospital superbug”, devido à sua associação com alta mortalidade e aumento nos custos de hospitalização (CDC, 1999; Whitby *et al.*, 2001; Bannerman, 2003; Shorr, 2007; Beeston *et al.*, 2009; Resch *et al.*, 2009). As bacteremias causadas por MRSA prolongam o tempo de hospitalização em 40% e aumentam o custo do tratamento em pelo menos 32% quando comparadas à bacteremias causadas por MSSA (Kopp *et al.*, 2004).

A prevalência das infecções por MRSA varia de acordo com a região, o hospital, o sítio da infecção e a origem (serviços de saúde ou comunitária). Nos Estados Unidos, por exemplo, as prevalências de MRSA entre os isolados hospitalares de *S. aureus* nos Estados Unidos variam de 33 a 55% (Appelbaum, 2006), mas representam mais de 50% das infecções por *S. aureus* em Unidades de Cuidados Intensivos (NNIS, 2004). Na Europa, a mesma taxa é de aproximadamente 20%, sendo que em Portugal e no Reino Unido essas taxas são próximas a 50% (Appelbaum, 2006). Nos países asiáticos, a situação é dramática, com cerca de 70% de MRSA dentre isolados de *S. aureus* provenientes de amostras hospitalares (Boyce *et al.*, 2005). A resistência dos *S. aureus* também é um importante

problema na América Latina: na Colômbia, dados de dez Unidades de Cuidados Intensivos revelaram que 65,4% dos isolados de *S. aureus* eram MRSA (Moreno *et al.*, 2006).

No Brasil, o *S. aureus* é o microrganismo mais freqüentemente isolado em infecções nosocomiais (Sader *et al.*, 2001; Guilarde *et al.*, 2007) e a proporção de MRSA entre os isolados de hemoculturas é de aproximadamente 30% (Sader *et al.*, 2002). No Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, MRSA são 40 a 70% dos isolados (de *et al.*, 2005) e aproximadamente 50% no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (Sadoyama e Gontijo Filho, 2000). Em Goiânia, um estudo no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás verificou que 55% das bacteremias por *S. aureus* foram atribuídas ao MRSA (Guilarde *et al.*, 2006).

Crianças e neonatos são particularmente vulneráveis a infecções por MRSA (Siegel *et al.*, 2006). Além da baixa idade, geralmente são fatores de risco para a aquisição de infecções por MRSA: colonização prévia por MRSA, uso prévio de antibiótico e maior tempo de internação (de Almeida Silva *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2009).

Estratégias de controle e prevenção de MRSA freqüentemente incluem uma ou mais das seguintes medidas: busca ativa de pacientes infectados e/ou colonizados por meio de culturas de vigilância; isolamento de pacientes infectados e/ou colonizados (Loveday *et al.*, 2006); profissionais de saúde exclusivos para o cuidado aos pacientes colonizados ou infectados (*staff cohorting* ou *nurse cohort*); adequada proporção enfermeiros e pacientes (Farrington *et al.*, 2000); higiene das mãos (WHO, 2009); descolonização; educação continuada; uso racional de antimicrobianos; precauções de contato; medidas ambientais e administrativas (Siegel *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2007).

Evidências mostram que culturas de triagem combinada com precauções de contato são benéficas e custo-efetivas (Muto *et al.*, 2003; Lucet *et al.*, 2005). Todavia, cada serviço de saúde, ao enfrentar um surto por MRSA, usualmente define um grupo de estratégias de controle que serão utilizadas. Isso ocorre provavelmente porque a aplicação de todas as medidas de controle apresenta custo elevado, exige treinamento dos técnicos de laboratório e também porque algumas medidas têm baixa aderência dos profissionais da saúde. Além disso, as evidências científicas de alta qualidade são insuficientes para apoiar um grupo específico das medidas de controle, bem como há que se considerar diferenças na epidemiologia local do MRSA, tipos de intervenções testadas, tempo de seguimento,

critérios de vigilância, dentre outros (Pfaller, 2001; Karchmer *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 2003; Wertheim e Vos, 2005; Coia *et al.*, 2006; Loveday *et al.*, 2006; McGinagle *et al.*, 2008; Nulens *et al.*, 2008; Al Reyami *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009; van Rijen e Kluytmans, 2009; Larson *et al.*, 2010). Contudo, reconhece-se como bem sucedida estratégia “search-&-destroy” para a erradicação de MRSA, adotada em alguns países da Europa e que inclui sistemático isolamento e rastreamento de pacientes de risco e isolamento e tratamento dos portadores e infectados. O sucesso dessa estratégia pode ser observado na Holanda que apresenta uma prevalência de MRSA entre isolados clínicos de *S. aureus* inferior a 1% (Wertheim *et al.*, 2004). Esse resultado provavelmente é também fruto de uma forte política restritiva de prescrição de antibióticos, o que limita a seleção de microrganismos resistentes.

1.7 O portador nasal de MRSA

O trato respiratório superior é um nicho ecológico para várias bactérias e a narina anterior é considerada um local de colonização primária de *S. aureus* e MRSA para adultos e crianças (Kluytmans *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2004; Wertheim *et al.*, 2005). Infecções e o uso de antimicrobianos são fatores importantes na alteração desse reservatório. O portador é a pessoa que está colonizada por um microrganismo e não mostra nenhuma evidência da doença (Irving *et al.*, 2005). Dependendo da interação microrganismo-hospedeiro, a infecção pode ser silenciosa (inaparente, assintomática, subclínica) ou se manifestar causando uma doença (Wertheim *et al.*, 2005).

Três padrões de portadores de *S. aureus* são descritos na literatura: i) persistentes - aproximadamente 20% da população, mais crianças que adultos; ii) intermitentes ou transitórios - 20 a 75% da população é colonizada por diferentes cepas com frequência variável e iii) não portadores - a minoria da população (VandenBergh *et al.*, 1999). Embora ainda não esteja claro porque certos indivíduos são portadores persistentes, sabe-se que ele apresenta maior risco para infecções sistêmicas (Wertheim *et al.*, 2005; van Belkum *et al.*, 2009), enquanto o portador intermitente tem risco de infecção semelhante aos não portadores (Nouwen *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que a média de sobrevivência de *S. aureus* nas narinas é de quatro dias para não portadores, 14 dias para os intermitentes e mais de 154 dias para os persistentes. Por esta razão, há autores que sugerem apenas dois

tipos de portador nasal: persistente e outros (van Belkum *et al.*, 2009).

Embora exista um grupo populacional de portadores intermitentes de *S. aureus*, vários estudos mostram diferenças nas prevalências de portador nasal de acordo com a população estudada, variando de 20-40%. Estas prevalências são maiores em crianças, idosos, homens, uso prévio de antibióticos, contato com trabalhadores da saúde, pacientes hospitalizados e co-morbidades (diabetes, HIV, asma) (Nakamura *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2003; Creech *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Graham *et al.*, 2006; Klevens *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2008; Gorwitz *et al.*, 2008; Lebon *et al.*, 2008; Lo *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos, a prevalência de colonização nasal por MRSA é de 0,84% entre indivíduos com idade maior ou igual a um ano (Graham *et al.*, 2006) e de 0,8% em menores de 21 anos atendidos em ambulatórios de Nashville, TN (Nakamura *et al.*, 2002). No Japão, identificou-se a prevalência de portadoras nasais de MRSA de 4,3% em crianças saudáveis (Boyce *et al.*, 2005) e, em Taiwan, foi encontrada uma alarmante prevalência de CA-MRSA de 13,2% em crianças da pré-escola (Lo *et al.*, 2007). Crianças tendem a apresentar taxas elevadas de colonização, provavelmente devido à maior frequência de infecções respiratórias.

No Brasil, há dez anos, encontrou-se uma prevalência de portador nasal de MRSA de 47,8% em recém-nascidos internados em duas Unidades de Cuidados Neonatais da cidade do Rio de Janeiro (Loureiro *et al.*, 2000). Um estudo recente mostrou 13,5% e 1,02% de colonização por *S. aureus* e MRSA SCCmec tipo IIIA, respectivamente, em crianças com infecções respiratórias e meningite, admitidas em hospitais de Goiânia (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2007). Posteriormente, outro estudo identificou uma prevalência de portadores de MRSA de 1,2% em crianças frequentadoras de creches em Goiânia, incluindo cepas SCCmec tipo IIIA (clone epidêmico brasileiro), IV (clone pediátrico) e V, evidenciando uma disseminação de CA-MRSA e HA-MRSA na comunidade (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2009).

Evidências genéticas mostram a relação causal entre portador nasal e doença invasiva (von Eiff *et al.*, 2001; Bertin *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). O estado de portador de HA-MRSA é considerado preditor de infecção, mas essa associação com o portador de CA-MRSA não é bem estabelecida (Grundmann *et al.*, 2006). Parece preocupante que, além disso, pouco se conhece sobre as mudanças nos padrões de colonização do CA-MRSA (Lee *et al.*, 2009).

Na cadeia de transmissão de MRSA no ambiente hospitalar (transmissão cruzada), trabalhadores da saúde portadores desempenham importante papel como fonte de surtos de infecção (Hitomi *et al.*, 2000). Todavia, a triagem para MRSA não é recomendada como rotina para a equipe de saúde, mas está indicada em situações especiais, como a persistência de surto. Dentre os motivos da não recomendação da triagem de trabalhadores de saúde, está a possibilidade de estigmatizar o profissional, mesmo quando se trata de portador transitório. Outras questões referem-se ao consentimento do profissional para a investigação, a confidencialidade dos resultados e a descolonização (Coia *et al.*, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Desde o século passado, o problema da resistência antimicrobiana tem sido uma importante preocupação para a saúde pública com sérias implicações econômicas e sociais. Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001) conclamou os países membros para traçar uma estratégia global para conter a “catástrofe” da resistência aos antimicrobianos. A falta de liderança, esforços humanos e financeiros inviabilizaram tal proposta resultando, em 2005, em um novo esforço para conter o avanço dos microrganismos resistentes. No entanto, pouco de tal recomendação foi implementada (Cars *et al.*, 2008).

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina disseminou nos hospitais e agora é endêmico em muitos países, incluindo o Brasil. Infecções por MRSA tem-se tornado uma das principais causas de epidemias em berçário ou em unidade de cuidados intensivos neonatais (UCINs) (Saiman *et al.*, 2003; Bertin *et al.*, 2006). Atualmente, o principal desafio é a disseminação do MRSA na comunidade e nos serviços de saúde (Harbarth *et al.*, 2001; Muto *et al.*, 2003; Siegel *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2007).

A colonização nasal frequentemente precede a infecção (Kluytmans *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2004; Wertheim *et al.*, 2005; Sakaki *et al.*, 2009). Considerando que neonatos podem ser portadores de *S. aureus* e MRSA, a permanência por meses numa UCIN os torna potenciais reservatório e fonte de infecção cruzada. Além da população neonatal, crianças que freqüentam serviços de saúde podem ser colonizadas, assim como, crianças já colonizadas podem disseminar cepas nesses ambientes. Entretanto, a maioria dos serviços de saúde não realiza culturas de vigilância de MRSA por meio de métodos moleculares, que apresentam maior poder discriminatório. Estudos que utilizam esses métodos com portadores nasais são escassos, mas são importantes porque apresentam a vantagem de monitorar as cepas circulantes regionais. Uma vez que crianças portadoras de *S. aureus* desempenham papel central na epidemiologia e disseminação do microrganismo (Chambers, 2001; Sdougkos *et al.*, 2008; Ozaki *et al.*, 2009), a detecção do portador nasal de *S. aureus* e de MRSA é importante para se compreender a epidemiologia da infecção e da colonização. Do mesmo modo, o conhecimento da potencial virulência e perfil de

resistência antimicrobiana, bem como o monitoramento da disseminação de cepas MRSA é imperativo. Mensurar a prevalência da colonização nasal por MRSA, com identificação molecular das cepas circulantes e dos potenciais fatores de risco na população infantil pode contribuir para a vigilância à saúde, subsidiar ações de vigilância e a conduta clínica.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a prevalência e fatores de risco de portador nasal por MRSA associados à comunidade e aos serviços de saúde em crianças atendidas em Pronto Atendimento de um hospital público e as admitidas em Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal do município de Goiânia.
- Analisar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e o fenótipo de resistência dos estafilococos isolados.
- Analisar a epidemiologia molecular das cepas MRSA detectadas e comparar a similaridade genética das mesmas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 *Delineamento do estudo*

O presente estudo foi conduzido no maior serviço de pronto atendimento (PA) do principal hospital público de referência em pediatria do município de Goiânia, Goiás, e em quatro Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCINs) do mesmo município (1.244.645 habitantes). Dentre as oito UCINs do município, foram selecionadas duas unidades públicas e duas da rede privada/conveniada para participarem do estudo, que contavam com maior número de leitos. No PA foi feito um estudo de corte transversal e, nas UCINs, foi conduzida uma coorte aberta prospectiva de todos os recém-nascidos admitidos no período do estudo (**tabela 4**).

4.2 *Populações do estudo*

Duas populações de crianças participaram do estudo. A primeira constituiu-se de crianças menores de 60 meses de idade, atendidas no PA durante o período de sazonalidade de infecção do trato respiratório (maio-outubro) nos anos de 2007 e 2008. No primeiro ano foram elegíveis crianças que compareceram ao PA independente do motivo da consulta e, no segundo ano, foram elegíveis crianças com sintomatologia respiratória. A segunda população foi composta por todos os recém-nascidos admitidos nas UCINs (**tabela 4**).

Tabela 4. Características das crianças estudadas. Goiânia, Goiás.

POPULAÇÃO DO ESTUDO	CARACTERÍSTICAS	LEITOS	PERÍODO
Crianças de 0-5 anos			
Pronto atendimento de hospital referência pediátrico			
Todos os motivos de atendimento	Público, Hospital Escola	NA ^a	jul/2007-set/2007
Sintomáticos respiratórios	Público, Hospital Escola	NA ^a	mai/2008-jul/2008
Recém-nascidos			
Hospital Materno-Infantil	Público, Hospital Escola	14	jun/2007-jan/2008
Hospital das Clínicas	Público, Hospital Universitário	9	jan/2008-nov/2008
Hospital da Criança	Privado, convênios e SUS	26	jul/2007-mai/2008
Hospital Santa Bárbara	Privado, convênios e SUS	11	out/2007-mai/2008

^aNA = Não se aplica

4.3 Amostragem e tamanho da amostra

O tamanho da amostra para as crianças atendidas no PA foi calculado, considerando uma prevalência de 1,2% de portador nasal por MRSA, encontrada em creches de Goiânia (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2007), precisão de 0,6, efeito do desenho de 1,6, erro alfa de 5% e 5% de recusa. O número de crianças recrutadas ao dia no PA considerou a capacidade do laboratório para processamento das amostras de *swab* nasal. Nas UCINs, uma vigilância de portadores nasais de *S. aureus* e MRSA foi realizada com todas as crianças admitidas. Crianças foram consideradas não elegíveis se os pais ou responsáveis legais não concordassem em participar do estudo.

4.4 Coleta de dados e de swab nasal

No PA, auxiliares de pesquisa treinados utilizaram um formulário estruturado para entrevistar pais ou responsáveis (anexo 2). Foram coletados dados relativos à criança e de condições da família. O instrumento de coleta de dados incluiu as seguintes variáveis relativas à criança: nome, idade (em meses), sexo, raça, malformação congênita, história de internação nos últimos seis meses, uso de antimicrobianos nos últimos três meses e, história de afecções dermatológicas, otite, pneumonia e amidalite nos últimos 12 meses. As variáveis relativas à família foram: nome da mãe, escolaridade da mãe da criança, renda mensal familiar, criança da família que freqüentou creche nos últimos seis meses, membro

da família tabagista, membro da família trabalhador da saúde e número de pessoas residentes no domicílio.

Nas UCINs, a coleta de dados foi realizada pelos pediatras responsáveis pela admissão do recém-nascido. O instrumento estruturado de coleta de dados (anexo 3) continha as seguintes variáveis relativas à criança: sexo, idade na internação, má formação congênita, baixo peso, prematuridade, uso de Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas (*Continuous Positive Airway Pressure* - CPAP), intubação, uso de sonda nasogástrica, tipo de hospital da internação. As variáveis maternas foram: escolaridade, número de consultas no pré-natal, tipo de parto, gestação múltipla, amniorrexe prematura.

Tanto no PA quanto nas UCINs, foram coletadas amostras biológicas utilizando-se *swabs* nasais. Os *swabs* foram coletados por médicos e enfermeiras treinadas, introduzindo nas duas narinas da criança. No PA foi coletada uma única amostra nas duas narinas de cada criança e, nas UCINs, foram coletadas duas amostras: uma na admissão e outra na alta ou óbito dos neonatos. Após a coleta, os *swabs* foram acondicionados em meio líquido (ESwab, Copan Diagnostics, Inc., Murrieta, CA, EUA) e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG para processamento imediato.

4.5 Procedimentos microbiológicos

Todos os testes para isolamento e identificação do *S. aureus*, assim como os testes de suscetibilidade e moleculares foram realizados no Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Foram considerados *S. aureus* meticilina-resistentes os isolados Gram positivos que apresentaram coagulase positiva, teste de disco de difusão para oxacilina $\leq 10\text{mm}$ e cefoxitina $\leq 21\text{mm}$, Etest para oxacilina com resultado de MIC $\geq 4\mu\text{g}$ e gene *mecA*.

4.5.1 Isolamento e identificação do *S. aureus*

O isolamento foi realizado pela semeadura das amostras em placas contendo ágar

manitol salgado (Difco®), triagem para MRSA em placas contendo ágar TSA (Trypticase Soy Agar) e caldo TSB (Trypticase Soy Broth) suplementados com 6 µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl, com posterior incubação por 24-48 horas a 37°C (**figura 2**). Todas as colônias com morfologia sugestiva de estafilococos que cresceram nos meios mencionados foram submetidas às provas de identificação.

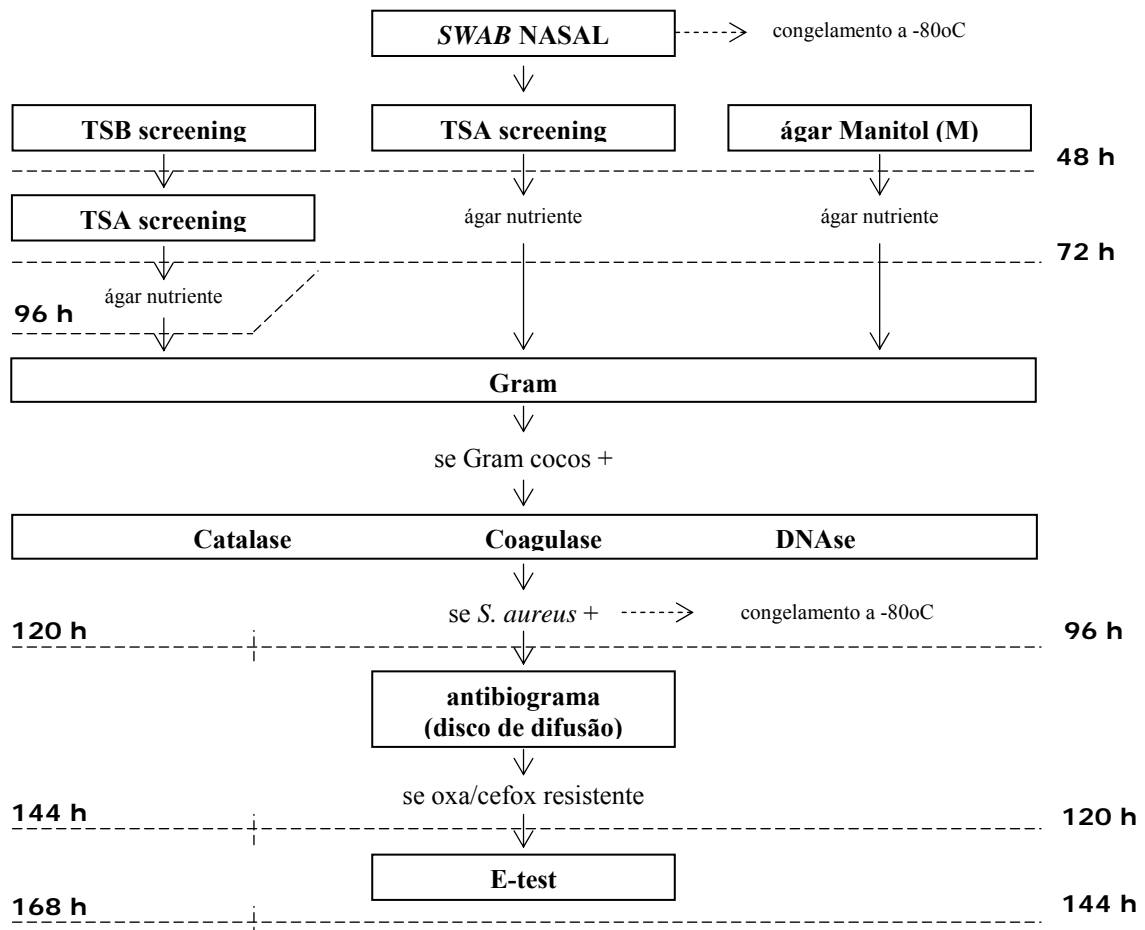


Figura 2. Procedimento operacional padrão de isolamento e identificação do *S. aureus*.

A identificação do *S. aureus* foi realizada segundo metodologia padronizada por Brown *et al.* (2005), que incluiu coloração de Gram, teste da catalase, produção de coagulase em tubo e desoxirribonuclease (DNase). Todos os isolados coagulase e DNase positivos identificados como *S. aureus* foram armazenados a -80°C em caldo TSB acrescido com 20% de glicerol para provas adicionais.

4.5.2 Testes de suscetibilidade

4.5.2.1 Disco de Difusão

Todos os isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos ao teste de disco de difusão conforme estabelecido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Um inóculo padrão de $1,5 \times 10^8$ ufc/mL (metade da turbidez da escala 1,0 de MacFarland) foi utilizado para semeadura das placas contendo Ágar Müeller-Hinton. Os discos de antimicrobianos (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) utilizados foram: cefoxitina (30µg), oxacilina (1µg), penicilina (10u), vancomicina (30µg), teicoplanina (30µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), dalfopristinaquinuspristina (15µg), rifampicina (30µg), ciprofloxacina (5µg), sulfametoxazoltrimetoprim (25µg), tetraciclina (30µg), linezolida (30µg). Para o controle de qualidade foram utilizadas as cepas ATCC de *S. aureus* 25923 e 29213.

4.5.2.2 Etest®

Os isolados de *S. aureus* que se mostraram resistentes à oxacilina e cefoxitina pelo método de disco difusão, foram submetidos à técnica do Etest® para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após subcultivos em ágar sangue por 24 horas à 37°C, um inóculo padrão foi preparado em salina 0,85% para obtenção de uma concentração de $1,5 \times 10^8$ ufc/mL e inoculado em ágar Mueller-Hinton. Tiras de Etest® (contendo concentração seriada de oxacilina) foram depositadas nas placas inoculadas e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura da CIM foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e os resultados interpretados conforme o CLSI (2007).

4.5.2.3 Detecção de resistência induzida à clindamicina (D-teste)

Quando os estafilococos apresentam fenótipo MLS de resistência induzível pode-se observar, *in vitro*, resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina. Para detectar este fenótipo, o teste de indução foi realizado conjuntamente com o método de disco difusão. Após preparação da cultura e inoculação das placas de Müeller-Hinton conforme

descrito no item 4.5.2.1, um disco de eritromicina (15µg) foi posicionado 15 mm centro a centro de um disco de clindamicina (2µg). Após incubação a 37°C por 24 horas, foram avaliados a forma e o tamanho do halo de sensibilidade a clindamicina. Os microrganismos que não apresentaram achatamento do halo foram considerados sensíveis à clindamicina e aqueles que apresentaram achatamento do halo (forma da letra D) na região adjacente ao disco de eritromicina foram considerados resistentes à clindamicina e D-teste positivo (CLSI, 2007).

4.5.3 Tipagem molecular

4.5.3.1 PCR para detecção do gene *mecA*

Os isolados sugestivos de MRSA detectados pela triagem e pelos testes de suscetibilidade foram submetidos à detecção do gene *mecA*, usado como marcador molecular para identificação de MRSA. A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo sugerido por van Soolingen *et al.* (1994) com modificações. Os microrganismos testes foram inoculados em caldo TSB e incubados por 24 horas a 37°C. Uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada à 5000x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 400µL de tampão Tris-EDTA (Tris 10mM, pH 7,5 e EDTA 1mM, pH 8,0) acrescido de 6µL de lisozima (20 mg/mL – Sigma, St Louis, MO, EUA). Em seguida a suspensão foi incubada à 37°C por 1 hora. Após esse período, 70µL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) e 12µL de proteinase K (20mg/mL – Invitrogen®) foram acrescentados à suspensão celular e novamente incubada à 56°C por 10 minutos. Em seguida, 10µL de NaCl 5,0M e 80µL de solução CTAB/NaCl (10% Brometo de cetiltrimetilamônio, 0,73M NaCl) foram adicionados à suspensão a qual foi agitada lentamente até a obtenção de um aspecto leitoso. Esta solução foi incubada por 10 minutos à 65°C. Após esta etapa foram acrescentados 650 µL de clorofil (clorofórmio álcool isoamílico 24:1, v/v), a suspensão homogeneizada por 30 segundos e centrifugada a 12.000x *g* por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, adicionado 400µL de isopropanol gelado e incubado a – 20°C por 24 horas. O sistema foi centrifugado a 18.000x *g* a 4°C por 20 minutos e posteriormente lavado com 1mL de álcool etílico a 70%, gelado. Os tubos foram invertidos para que houvesse a evaporação do álcool. O DNA

foi ressuspensão em 50µL de água miliQ esterilizada e utilizado como DNA *template* para as reações que utilizam PCR.

Os *primers* utilizados para a amplificação do gene *mecA* foram desenhados baseado na sequência depositada no GenBank sob número AB063481 (Geha *et al.*, 1994):

MECA1: 5' - AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGGC – 3'

MECA2: 5' - CTG CAG TAC CGG ATT TGC – 3'

A mistura de reação foi preparada em um volume final de 30µL contendo tampão de reação (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂); 80µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (ABgene®); 0,25µM de cada *primer*; 1U de GoTaq Green Master Mix (Promega®, e 20ng do DNA *template*). A reação de amplificação foi realizada no termociclador MJ96G Biocycler (Biosystems®) seguindo o programa: 3 minutos 94°C, 35 ciclos de 50 segundos a 92°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até a sua análise por eletroforese.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®); acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA 1x por 30 minutos a 80V. O marcador de 1 kb (Invitrogen®) foi utilizado como padrão de peso molecular, o DNA da cepa BRZ28 como controle positivo e água miliQ esterilizada como controle negativo. O produto da amplificação foi visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

4.5.3.2 PCR para detecção do gene *femB*

Todos os isolados identificados como MRSA foram submetidos à confirmação da identificação da espécie conforme protocolo sugerido por Jonas *et al.* (1999). A sequência dos *primers* utilizados para a obtenção de um produto de 651 bp foi:

FemB1 (F₀₆): 5' - TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC - 3'

FemB2 (F₀₇): 5' - ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT – 3'

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo metodologia descrita no item 4.5.3.1. A mistura de reação foi preparada em um volume final de 30µL contendo tampão de reação (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂); 80µM de cada

dNTP (ABgene®); 0,25µM de cada *primer*; 1U de GoTaq Green Master Mix (Promega®) e 20ng do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MJ96G Biocycler (Biosystems®) seguindo o programa: 3 minutos 94°C, 35 ciclos de 50 segundos a 92°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 5 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até a sua análise por eletroforese.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®), suplementado com 0,05 µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA 1x por 90 minutos a 90V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de 1 Kb (Invitrogen®). Os fragmentos de DNA produzidos foram visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta.

4.5.3.3 PCR Multiplex para a Determinação do Tipo de SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando-se o método de PCR multiplex, conforme protocolo sugerido por Milheiriço *et al.* (2007), no qual é possível identificar os seis tipos de SCCmec. Foram utilizados 10 *loci* selecionados com base nas seqüências do elemento SCCmec. Para o SCCmec tipo I foi utilizado o *locus* A, localizado na região posterior do gene *pls*; para o SCCmec tipo II foi utilizado o *locus* B que é um fragmento interno do operon *kdp*; para o SCCmec tipo II e III foi utilizado o *locus* C que é um fragmento interno do gene *mecI*; para os SCCmec tipo I, II e IV foi utilizado o *locus* D, fragmento interno da região *dcs*; para o SCCmec tipo III foram utilizados o *locus* E que fica na região entre o plasmídeo PI 258 e o transposon Tn554 e o *locus* F localizado na região entre o Tn554 e a junção cromossômica direita (*orfX*); para distinguir as variantes estruturais IA e IIIA foram utilizados os *loci* G e H que correspondem a junção esquerda entre a seqüência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110 (IA) e a junção esquerda entre a seqüência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181 (IIIA), respectivamente. Foram usados ainda, oito novos *primers* para detectar o *ccrB* alotipo 2 (específico para tipos II e IV), *ccrC* e a região J1 do tipo V (específicos para tipo V), e a região J1 do SCCmec III. A detecção dos plasmídeos pUB110 e pT181 foi abandonada uma vez que não eram críticas para a classificação do tipo de SCCmec. As respectivas seqüências de *primers* utilizadas para identificar cada tipo de SCCmec deste protocolo estão descritos no **tabela 5**.

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo metodologia descrita no item 4.5.3.1. Para a reação de PCR foi utilizado tampão de reação (20mM Tris-HCl, pH

8,4; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂); 40µM de cada dNTP (MARCA), 200ηM dos *primers* kdp F1, kdp R1, 400ηM dos *primers* CIF2 F2, CIF2 R2, RIF5 F10, RIF5 F13, SCC*mec* III J1F, SCC*mec* III J1R, SCC*mec* V J1F, SCC*mec* V J1R; 800ηM dos *primers* *mecI* P2, *mecI* P3, dcs F2, dcs R1, *mecA* P4, *mecA* P7, *ccrB2* F2, *ccrB2* R2, *ccrC* F2, *ccrC* R2; 1,25U de GoTaq Green Master Mix (Promega®) e 5ηg de DNA *template*. Todas as ampliações por PCR foram realizadas com o termociclador MJ96G Biocycler (Biosystems®) utilizando o seguinte programa: 4 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão adicional de 4 minutos a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Tabela 5. Seqüência dos inicializadores utilizados para PCR *multiplex* para a determinação dos tipos de SCC*mec*.

<i>Primers</i>		Seqüência de oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (pb)	Especificidade
CIF2 F2	CIF2 R2	TTTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	SCC <i>mec</i> tipo I
kdp F1	kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAAGAAAGTGG	284	SCC <i>mec</i> tipo II
RIF5 F10	RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATCCATCAATGC	414	SCC <i>mec</i> tipo III
SCC <i>mec</i> III J1 F	SCC <i>mec</i> III J1 R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	SCC <i>mec</i> tipo III, J1
<i>mecI</i> P2	<i>mecI</i> P3	ATCAAGACTTGCATTACAGGC GCGGTTTCAATTCACCTGTC	209	SCC <i>mec</i> tipos II e III
dcs F2	dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	SCC <i>mec</i> tipos I, II e IV
<i>ccrB2</i> F2	<i>ccrB2</i> R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	311	SCC <i>mec</i> tipos II e IV
<i>ccrC</i> F2	<i>ccrC</i> R2	GTA CTCTGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	SCC <i>mec</i> tipo V
SCC <i>mec</i> V J1 F	SCC <i>mec</i> V J1 R	TTCTCCATTCTGTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	SCC <i>mec</i> tipo V
<i>mecA</i> P4	<i>mecA</i> P7	TCCAGATTACAACCTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	<i>mecA</i> (controle interno)

Fonte: Milheiro *et al.* (2007), adaptado por Inoue (2008).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% (Invitrogen®), suplementado com 0,05µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5x por 2,5 horas à 4V, visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta. O marcador 1 Kb (Invitrogen®) foi utilizado como padrão de peso molecular e as cepas COL (SCC*mec* tipo I), N315 (SCC*mec* tipo II), ANS46 (SCC*mec* tipo III) e MW2 (SCC*mec* tipo IV) foram utilizadas como controle positivo para os diferentes tipos de SCC*mec*.

4.5.3.4 Eletroforese em Gel em Campo Elétrico Pulsado (PFGE)

Todas as cepas MRSA foram submetidas à determinação do perfil de macrorestrição do DNA cromossômico pelo método da eletroforese em gel em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *SmaI*, realizada segundo protocolo estabelecido por Chung *et al.* (2000) com modificações.

Uma colônia do isolado teste foi semeado em uma placa de TSA e incubado a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, uma colônia foi inoculada em 5mL de TSB e incubada a 37°C por 18-24 horas, sob agitação vigorosa. Um volume de 500µL da suspensão de células foi transferido para um microtubo de 1,5mL, centrifugado a 14.000x g por 2 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. O centrifugado foi ressuspensão em 500µL da solução tampão Tris-NaCl (Tris 10mM, pH 8,0, NaCl 1M) e novamente centrifugado a 14.000x g por 2 minutos. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 200µL de solução tampão Tris-NaCl e a concentração celular ajustada com a mesma solução tampão pelo cálculo da OD_{620nm} ($Vol_{add} (\mu L) = OD \times 40 \times 210 - 210$). Uma alíquota de 100µL da suspensão celular ajustada foi homogeneizada com 100µL de gel de agarose LPM 1,5% (Invitrogen®) para formação de pequenos blocos de agarose (*plugs*).

Os *plugs* contendo as bactérias foram incubados por um período de 5 horas a 37°C em solução de lise EC (Tris 6mM, pH 8,0; NaCl 1M; EDTA 0,1M, pH 8,0; desoxicolato de sódio 0,2% e sódio laurylsarcosina 0,5%) acrescida de RNase (50µg/mL, Invitrogen®), lisozima (100 µg/mL, Sigma®) e lisostafina (50 µg/mL, Sigma®). A seguir, a solução EC-lise foi desprezada e os blocos de gel novamente incubados em solução ES (EDTA 0,5M, pH 9,0 e sódio laurylsarcosina 1%) com Proteinase K (1 mg/mL, Invitrogen®); por um período mínimo de 17 horas à uma temperatura de 50°C. Após a incubação, os *plugs* foram lavados (5 lavagens com incubações de 30 minutos cada) com a solução tampão Tris-EDTA (Tris 10mM, pH 7,5 e EDTA 1mM, pH 8,0) e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Para cada isolado MRSA, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com 20U da enzima *SmaI* (Invitrogen®), em 40µL do tampão de restrição 1x e incubado a 25°C por uma noite. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (Invitrogen®), em solução tampão Tris-Borato-EDTA 0,5x (Tris 90mM, ácido bórico

90mM e EDTA 2mM) no sistema CHEF DRII (Bio-Rad®). Para a resolução dos fragmentos de restrição foi utilizado corrente alternando com intervalos de pulso de 5 a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 12°C por 23 horas. Os géis foram corados em 300ml de solução aquosa contendo 0,5µL/mL de Gel Red (Uniscience®) durante 20 minutos, descorados em água destilada por mais uma hora, fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta e capturados com o sistema Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad®). As fotos foram digitalizadas e armazenadas para análise posterior. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o *Lambda DNA ladder* PFGE (New England Biolabs®) posicionado na primeira e última coluna de cada gel. Além do peso molecular, foram incluídas três cópias da cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325 (número de acesso GenBank CP000253) posicionadas a cada seis isolados MRSA. Para finalidade de comparação, também foram incluídos nos experimentos, representantes dos clones MRSA internacionais listados na **tabela 6**.

Tabela 6. Clones internacionais de MRSA utilizados para comparação dos isolados MRSA por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Referência	Clone	SCCmec	MLST	spa type
HU25	Clone Epidêmico Brasileiro	IIIA	ST239	t138
BK2464	Clone Nova Iorque/Japão	II	ST5	t002
HDE288	Clone Pediátrico	IV	ST5	t002
HAR24	EMRSA-15	IV	ST22	t022
USA 300	USA 300	IV	ST8	t008
USA1100	Oceania South Pacific Clone	IV	ST30	t012

A análise do perfil dos fragmentos de macrorrestrição resultantes foi conferida visualmente segundo os critérios sistematizados por Tenover *et al.* (1995): (i) cepas geneticamente indistinguíveis, quando as cepas apresentaram perfil de restrição com o mesmo número de bandas e correspondência de tamanho entre elas; (ii) cepas estritamente relacionadas, quando as cepas diferiram em duas a três bandas nos perfis de restrição; (iii) cepas possivelmente relacionadas, quando as cepas diferiram em 4 a 6 bandas nos perfis de restrição e (iv) cepas não relacionadas, quando as cepas diferiram em sete ou mais bandas nos perfis de restrição.

Adicionalmente, os géis de PFGE foram utilizados como imagens preto e branco invertidas de 8 bits e processados pelo *software* BioNumerics v.5.0. O processo de normalização intra e inter géis foi padronizado com a cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325, que após digestão com a enzima de restrição *SmaI* produz bandas visíveis entre 674 kb e 9 kb. Todas as bandas dos isolados MRSA situadas acima da maior banda (674 kb) e abaixo da menor banda (9 kb) da NCTC 8325 foram excluídas da análise. A construção do dendrograma, para avaliar a relação genética entre as cepas foi realizada utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice (1945), baseado na posição e presença das bandas e no algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair-Groups Method*) por meio de agrupamentos por médias não ponderadas (Seath e Sokal, 1973). Os parâmetros de otimização e tolerância foram utilizados com os respectivos valores, 1,0 e 1,5%. Cada *cluster* de isolados foi definido como um grupamento de perfis ($n > 2$) apresentando um coeficiente de similaridade acima de 80% (Carrico *et al.*, 2005).

4.5.3.5 *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

A técnica de MLST baseia-se no sequenciamento de fragmentos internos (~450bp) altamente conservados de sete genes constitutivos específicos para a espécie *Staphylococcus* sp. O método foi utilizado para caracterizar todas as cepas MRSA seguindo protocolo de Enright *et al.* (2000). As sequências dos pares de *primers* utilizados para a amplificação dos sete genes estão descritos na **tabela 7**.

A extração do DNA genômico foi realizada conforme metodologia descrita no item 4.5.3.1. A reação de PCR foi preparada em um volume final de 50µL contendo tampão de reação (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂); 80µM de cada dNTP (ABgene®); 0,25µM de cada *primer*; 1U de GoTaq Green Master Mix (Promega®) e 20ng do DNA *template*. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MJ96G Biocycler (Biosystems®) seguindo o programa: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até a sua análise por eletroforese.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1% (Invitrogen®) com 0,05 µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA 1x por 30 minutos a 120V. Foi utilizado como padrão de peso molecular o marcador 1 Kb (Invitrogen®) e os fragmentos de DNA resultantes, visualizados e fotografados sob

transiluminação ultravioleta.

Tabela 7. Sequência dos *primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
Carbamato quinase (arcC)	arc-f	CCTTTATTTGATTACACCAGCG
	arc-r	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimato desidrogenase (aroE)	aro-f	ATCGGAAATCCTATTTCACATTC
	aro-r	GGTGTGTATTAATAACGATATC
Glicerol quinase (glpF)	glp-f	CTAGGAAGTCAATCTTAATCC
	glp-r	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanilato quinase (gmk)	gmk-f	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	gmk-r	TCATTAAGTACAACGTAATCGTA
Fosfato acetiltransferase (pta)	pta-f	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG
	pta-r	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
Triosefosfato isomerase (tpi)	tpi-f	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA
	tpi-r	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC
Acetil coenzima A acetiltransferase (yqiL)	yqi-f	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC
	yqi-r	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC

Após a eletroforese, os *amplicons* positivos para cada gene foram purificados com o kit *BigDye® X Terminator™ Purification* (Biosystems®). As sequências de DNA obtidas foram analisadas com o auxílio do *software* Lasergene® v.8.0 (DNASTAR, Inc). As sequências consensos resultantes foram submetidas ao servidor MLST (<http://www.mlst.net>) atribuindo para cada *locus*, um número de alelo distinto. Um perfil alélico foi gerado para cada um dos sete genes e o ST.

4.5.3.6 *Spa typing*

O gene da proteína A (*spa*) possui em sua constituição uma região polimórfica X a qual apresenta pequenas seqüências de repetição de número variável. Esta região foi utilizada para determinar o *spa type* de todas as cepas MRSA baseado em protocolos previamente sugeridos (Koreen *et al.*, 2004; Hanssen e Ericson Sollid, 2006). A seqüência do par de *primers* utilizada para a amplificação da região X foram:

spa 113F: 5'- TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C – 3'

spa 1514R: 5'- CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT – 3'

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método descrito no item 4.5.3.1. A mistura de reação foi preparada em um volume de 50µL contendo tampão de reação

(20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂); 80µM de cada dNTP (ABgene®); 0,25µM de cada *primer*; 1U de GoTaq Green Master Mix (Promega®) e 20ng do DNA *template*. O termociclador MJ96G Biocycler (Biosystems®) foi programado com os seguintes parâmetros: 5 minutos a 80°C, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C e uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C. Os tubos de PCR foram mantidos a 4°C até a sua análise por eletroforese. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8% (Invitrogen®) acrescentado de 0,5 µg/mL de brometo de etídio (10 mg/L) em tampão Tris-Borato-EDTA 1X por 1 hora a 90V.

Os produtos de PCR que amplificaram a região X foram purificados e sequenciados como descrito no item 4.5.3.1. A análise das sequências obtidas foi realizada com o *software* Ridom Staphtype v.1.5.13. Os *repeats* que compõem a região polimórfica X e que definem um *spa type* podem apresentar 21, 24 ou 27 bp. Cada *repeat* difere um do outro por pelo menos um evento de mutação pontual. Baseado no valor qualitativo de cada base na curva espectral da sequência, o software constrói uma sequência consenso resultante de ambas as direções, detecta automaticamente os *spa repeats* e atribui um *spa type* (numérico).

4.6 *Análise de Dados*

Os dados foram digitados e analisados usando o *software* SPSS versão 15.0. Foi realizada análise descritiva e calculada as prevalências de portador de *S. aureus* e de MRSA com intervalos de 95% de confiança (IC95%). Para os neonatos admitidos nas UCINs calculou-se também a incidência de MRSA como o percentual de crianças com *swab* positivo para MRSA no momento da alta em relação ao total de crianças com *swab* negativo para MRSA na admissão. Isolados com resistência a representantes de três classes de antimicrobianos (clindamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim), em adição aos β-lactâmicos, foram definidos como MRSA multirresistentes. Gráficos-caixa foram produzidos para avaliar a dispersão de variáveis contínuas e presença de valores discrepantes em relação ao conjunto de dados remanescente (*outliers* e *extreme outliers*). Para comparar o tempo de internação entre os neonatos portadores de MRSA e os não portadores de MRSA, os valores *outliers* e *extreme outliers* foram excluídos.

A análise univariada foi realizada para avaliar potenciais fatores associados ao portador de *S. aureus* e de MRSA, usando o teste qui-quadrado e o teste exato de Fisher quando apropriado. Diferenças de médias foram obtidas para variáveis contínuas usando ANOVA. Assim, todas as variáveis com $p < 0,10$ na análise univariada foram incluídas no modelo final de regressão logística (*stepwise backward*). O método passo a passo foi empregado para manter nos modelos de regressão apenas as variáveis independentes com $p < 0,05$. O modelo final foi avaliado pelo teste de Hosmer e Lemeshow (2000).

4.7 Aspectos éticos

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos e Animais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (processo nº 008/2007) (anexo 4). Todos os pais ou responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Acesso aos Dados Médicos (ADM) para participação do estudo.

5 RESULTADOS

Um total de 2.735 crianças participou do estudo, com coleta de *swab* nasal. No PA (n=2.034) a média de idade foi de 21,6 meses (sd=16,04 meses), sendo que 61,5% eram menores de 24 meses. Quanto ao gênero, 54,5% eram do sexo masculino, 24,7% tinham pelo menos uma criança na família que freqüentou creche nos últimos 6 meses, 28,9% das crianças internaram nos últimos 6 meses, 3,4% apresentavam malformação congênita e 25,1% tinham renda familiar de um salário mínimo ou menos. Nas UCINs foram coletadas amostras de 701 (98,7%) dos 710 neonatos admitidos (**figura 3**), sendo que 74,0% dos RN recrutados foram internados nas primeiras 24 horas de vida, 66,7% nasceram no próprio hospital, 32,3% vieram transferidos de outros hospitais e 0,9% vieram do domicílio. A maioria dos recém-nascidos era do sexo masculino (57,7%), 56,5% nasceram com baixo peso, 65,9% pré-terms, 16,9% apresentavam malformação congênita, 40,3% usaram CPAP (*Continuous Positive Airway Pressure*), 75,3% internaram em hospitais privados e 38,3% das mães tinham escolaridade até o ensino fundamental.

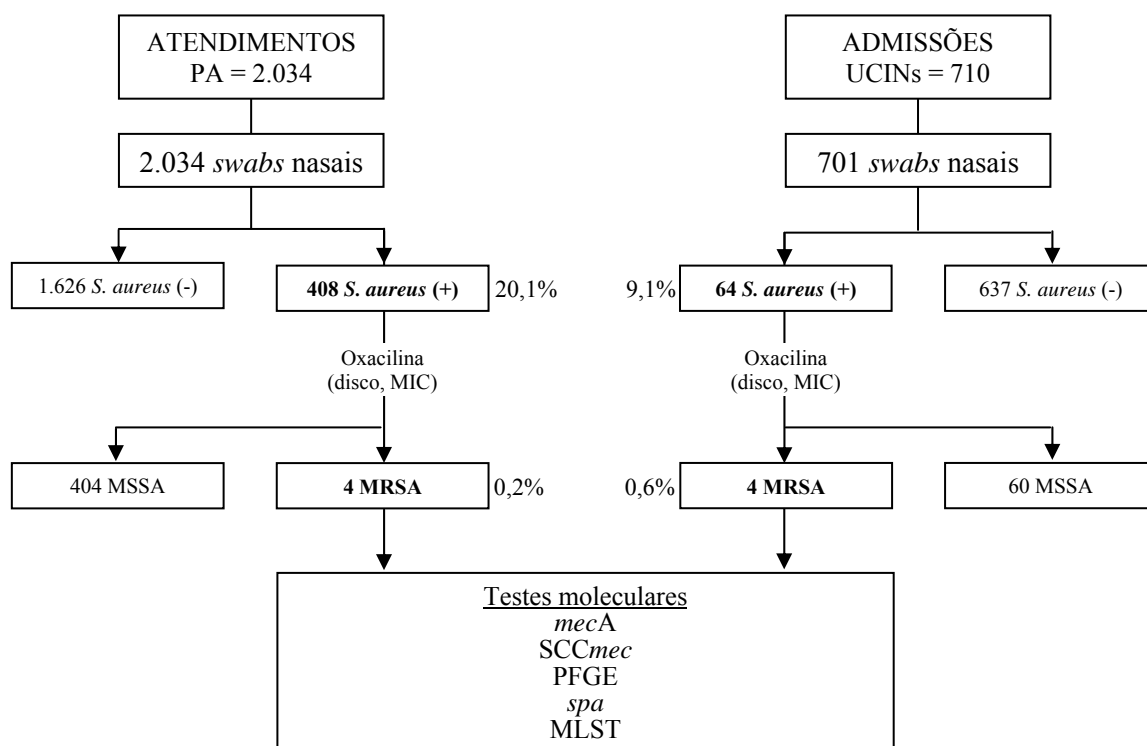


Figura 3. Fluxograma do estudo.

5.1 Prevalência de portador de *Staphylococcus aureus* e MRSA

Pronto Atendimento - Dos 2.034 participantes, 408 (20,1%) eram portadores de *S. aureus* e quatro (0,2%) foram MRSA, positivos para o gene *mecA*. As prevalências de portador de *S. aureus* e de MRSA não diferiram, estatisticamente, nos dois grupos de crianças *avaliadas*: aquelas atendidas por todos os motivos e aquelas com sintomas respiratórios, respectivamente 22,5% e 18,4% para *S. aureus* e 0,1% e 0,2% para MRSA (**tabela 8**).

Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal - As prevalências de *S. aureus* variaram de 0,03% a 15,7% e, as prevalências de MRSA, de 0,0% a 2,0% por UCIN (**tabela 2**).

Tabela 8. Prevalência de portador de *Staphylococcus aureus* e de MRSA de acordo com os grupos populacionais.

POPULAÇÕES ESTUDADAS	N	PREVALÊNCIA			
		<i>S. aureus</i>		MRSA	
		n	% (IC95%)	n	% (IC95%)
Pronto Atendimento					
todos os motivos de atendimento	816	184	22,5 (19,8-25,6)	1	0,1 (0,0-0,8)
sintomáticos respiratórios	1218	224	18,4 (16,3-20,7)	3	0,2 (0,1-0,8)
Subtotal	2034	408	20,1(18, 4-21,9)	4	0,2 (0,1-0,5)
UCIN					
Hospital Materno-Infantil	93	5	5,4 (1,2-12,7)	0	0,00
Hospital das Clínicas	426	41	9,6 (7,1-12,9)	2	0,5 (0,1-1,9)
Hospital da Criança	102	16	15,7 (9,5-24,5)	2	2,0 (0,3-7,6)
Hospital Santa Bárbara	80	2	0,03 (0,4-9,6)	0	0,00
Subtotal	701	64	9,1 (7,2-11,6)	4	0,6 (0,28-1,6)
Total	2735	472	17,3 (15,9-18,7)	8	0,3 (0,1-0,6)

5.2 Potenciais fatores associados ao portador de *S. aureus* e MRSA

Pronto Atendimento - Em análise univariada (**tabela 9**), os fatores estatisticamente significantes associados à colonização nasal por *S. aureus* foram: idade > 23 meses, sexo masculino, raça não-branca e sem uso de antibióticos nos últimos três

meses. Para colonização nasal por MRSA foram estatisticamente significantes renda mensal \leq a um salário mínimo e freqüentar creche nos últimos seis meses.

Tabela 9. Potenciais fatores associados à colonização nasal de *Staphylococcus aureus* e MRSA^a em crianças atendidas no serviço de Pronto Atendimento.

CARACTERÍSTICAS	<i>Staphylococcus aureus</i>						MRSA ^a					
	sim ^b		não ^b		total ^b		p	sim		não ^b		p
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
CRIANÇA												
Sexo												
masculino	247	60,5	861	53,0	1108	54,5	0,006	2	50,0	1106	54,5	1,000
feminino	161	39,5	765	47,0	926	45,5		2	50,0	924	45,5	
Faixa etária												
> 23 meses	217	53,2	567	34,9	784	38,5	0,000	1	25,0	783	38,6	1,000
\leq 23 meses	191	46,8	1059	65,1	1250	61,5		3	75,0	1247	61,4	
Raça												
outra	265	65,0	963	59,3	1228	60,5	0,038	1	25,0	1227	60,5	0,307
branca	143	35,0	660	40,7	803	39,5		3	75,0	800	39,5	
Malformação congênita												
sim	11	2,7	58	3,6	69	3,4	0,382	2	50,0	67	3,3	0,007
não	397	97,3	1565	96,4	1962	96,6		2	50,0	1960	96,7	
Afeções dermatológicas												
sim	107	26,2	463	28,5	570	28,0	0,362	0	0,0	570	28,1	0,582
não	301	73,8	1162	71,5	1463	72,0		4	100,0	1459	71,9	
Otite nos últimos 12 m												
sim	144	35,3	608	37,3	752	37,0	0,432	1	25,0	751	37,0	1,000
não	264	64,7	1018	62,6	1282	63,0		3	75,0	1279	63,0	
Pneumonia nos últimos 12 m												
sim	133	32,7	490	30,1	623	30,6	0,320	3	75,0	620	30,6	0,088
não	274	67,3	1136	69,9	1410	69,4		1	25,0	1409	69,4	
Amidalite nos últimos 12 m												
sim	233	57,1	907	55,9	1140	56,1	0,638	1	25,0	1139	56,1	0,326
não	175	42,9	718	44,2	893	43,9		3	75,0	890	43,9	
Internação nos últimos 6 m												
sim	115	28,2	471	29,0	586	28,9	0,740	3	75,0	583	28,8	0,075
não	293	71,8	1152	71,0	1445	71,1		1	25,0	1444	71,2	
Antibiótico nos últimos 3 m												
não	190	52,5	683	46,8	873	47,9	0,053	3	75,0	870	47,9	0,355
sim	172	47,5	776	53,2	948	52,1		1	25,0	947	52,1	
FAMILIA												
Escolaridade da mãe												
\leq 8 anos	188	46,1	705	43,5	893	55,1	0,352	2	50,0	891	44,0	1,000
> 8 anos	220	53,9	915	56,5	1135	44,9		2	50,0	1133	56,0	
Tabagista em casa												
Sim	126	30,9	569	35,0	695	34,2	0,116	2	50,0	693	34,2	0,610
Não	282	69,1	1056	65,0	1338	65,8		2	50,0	1336	65,8	
Renda mensal												
\leq 1 SM ^c	107	26,8	392	24,6	499	25,1	0,369	3	75,0	496	25,0	0,051
> 1 SM	292	73,2	1199	75,4	1491	74,9		1	25,0	1490	75,0	
Creche nos últimos 6 m												
Sim	100	24,6	401	24,8	501	24,7	0,934	3	75,0	498	24,6	0,049
Não	307	75,4	1218	75,2	1525	75,3		1	25,0	1524	75,4	
Trabalhador da saúde na família												
Sim	27	6,6	82	5,0	109	5,4	0,207	0	0,0	109	5,4	1,000
Não	381	93,4	1544	95,0	1925	94,6		4	100,0	1921	94,0	
Nº de pessoas na família												
> 4	134	32,8	542	33,4	676	33,3	0,833	1	25,0	675	33,3	1,000
\leq 4	274	67,2	1081	66,6	1355	66,7		3	75,0	1352	66,7	

^a MRSA = *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

^b o número total não é o mesmo para todas as variáveis porque os valores sem informação foram excluídos da análise.

^c SM= Salário mínimo

As variáveis com valor de $p < 0,10$ na análise univariada foram incluídas no modelo final de regressão logística multivariada. Fatores independentes associados à colonização por *S. aureus* no PA foram (**tabela 10**): idade ≥ 24 meses (OR=2,2; $p=0,000$), sexo masculino (OR=1,5; $p=0,002$) e uso de antibiótico nos últimos três meses (OR=0,78 $p=0,040$). Para MRSA, permaneceram independentemente associados à colonização: malformação congênita (OR=26,8; $p=0,002$) e criança ou algum membro da família que frequentou creche nos últimos seis meses (OR=10,6; $p=0,045$).

Tabela 10. Análise multivariada dos fatores de risco para colonização nasal de *Staphylococcus aureus* e MRSA^a em crianças atendidas no serviço de Pronto Atendimento.

Fatores	OR _{ajust} ^b	IC 95%	p
<i>S. aureus</i> ^c			
idade ≥ 24 m	2,2	1,74-2,79	0,000
sexo masculino	1,5	1,15-1,85	0,002
uso de antibiótico nos últimos 3 meses	0,8	0,62-0,99	0,040
MRSA ^d			
malformação congênita	26,8	3,48-205,75	0,002
frequentou creche nos últimos 6 meses	10,6	1,05-106,96	0,045
renda < 1 SM	9,2	0,91-92,03	0,060

^a MRSA = *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

^b OR_{ajust} = Odds Ratio ajustado.

^c ajustado por: raça.

^d ajustado por: sexo, idade, pneumonia nos últimos 12 meses, internação nos últimos 6 meses.

Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal – Os fatores associados ao *S. aureus* e ao MRSA em análise univariada são mostrados na **tabela 11**. Todos os casos de MRSA eram de hospitais privados e nasceram por parto cesáreo. Ter sido admitido em hospital privado e internação menor que 24 horas após o nascimento permaneceram associados à colonização nasal para *S. aureus* em análise multivariada (**tabela 12**). A **figura 4** mostra a dispersão do tempo de internação dos neonatos em relação à colonização por MRSA. Observa-se que a mediana do tempo de internação em dias entre as crianças colonizadas por MRSA foi maior do que a das não colonizadas por MRSA ($p=0,023$). A **tabela 13** mostra as características clínicas e microbiológicas das crianças portadoras de MRSA hospitalizadas nas UCINs.

Tabela 11. Potenciais fatores associados à colonização nasal de *Staphylococcus aureus* e MRSA^a em neonatos admitidos em Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal.

Potenciais fatores de risco	<i>S. aureus</i>			P	MRSA		P
	sim ^b	não ^b	total ^b		sim	não ^b	
	n %	n %	n %		n %	n %	
Sexo							
masculino	43 67,2	361 56,8	404 57,7	0,108	2 50,0	402 57,8	1,000
feminino	21 32,8	275 43,2	296 42,3		2 50,0	294 42,2	
Idade da internação							
≥ 24 horas	23 35,9	159 25,0	182 26,0	0,056	1 25,0	181 26,0	1,000
< 24 horas	41 64,1	478 75,0	519 74,0		3 75,0	516 74,0	
Tipo de hospital							
privado	57 89,1	471 73,9	528 75,3	0,007	4 100,0	173 24,8	-
público	7 10,9	166 26,1	173 24,7		0 0,0	524 75,2	
Escolaridade da mãe							
≤ 8 anos	26 41,9	231 37,9	257 38,3	0,537	0 0,0	257 38,5	-
> 8 anos	36 58,1	378 62,1	414 61,7		4 100,0	410 61,5	
Mãe formação							
sim	6 9,4	110 17,5	116 16,9	0,099	1 25,0	115 16,7	0,520
não	58 90,6	510 82,5	568 83,1		3 75,0	575 83,3	
Nº de consultas pré-natal							
< 7	32 52,5	378 63,7	410 62,7	0,083	2 50,0	408 62,8	0,632
≥ 7	29 47,5	215 36,3	244 37,3		2 50,0	242 37,2	
Tipo de parto							
cesárea	43 67,2	390 61,8	433 62,3	0,397	4 100,0	429 62,1	-
vaginal	21 32,8	241 38,2	262 37,7		0 0,0	262 37,9	
Baixo peso							
sim	34 53,1	359 56,9	393 56,5	0,562	2 50,0	391 56,6	1,000
não	30 46,9	272 43,1	392 43,5		2 50,0	300 43,4	
Pré-termo							
sim	36 58,1	411 66,7	447 65,9	0,170	3 75,0	444 65,9	1,000
não	26 41,9	205 33,3	231 34,1		1 25,0	230 34,1	
Gestação múltipla							
sim	9 14,1	49 7,8	58 8,4	0,084	0 0,0	58 8,4	1,000
não	55 85,9	580 92,2	635 91,6		4 100,0	631 91,6	
Amniorrexe prematura							
sim	4 10,8	94 19,1	98 18,5	0,274	1 25,0	97 18,4	0,560
não	33 89,2	399 80,9	432 81,5		3 75,0	429 81,6	
CPAP ^c							
sim	16 26,7	258 41,7	274 40,3	0,024	2 50,0	272 40,3	1,000
não	44 73,3	361 58,3	405 59,7		2 50,0	403 59,7	
Intubação							
sim	31 50,8	335 54,0	366 53,7	0,631	3 75,0	363 53,6	0,628
não	30 49,2	285 46,0	315 46,3		1 25,0	314 46,4	
Sonda nasogástrica							
sim	22 36,7	230 37,2	252 37,1	0,940	2 50,0	250 37,0	0,630
não	38 63,3	389 62,8	427 62,9		2 50,0	425 63,0	

^a MRSA = *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

^b o número total não é o mesmo para todas as variáveis porque os valores em branco foram excluídos da análise.

^c Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas (*Continuous Positive Airway Pressure*).

Tabela 12. Análise multivariada dos fatores de risco para colonização nasal de *S. aureus* em crianças admitidas nas UCINs^a de Goiânia.

Fatores	OR _{ajust} ^b	IC 95%	p
Hospital privado	2,68	1,12-6,46	0,028
Internação ≥ 24 horas do nascimento	1,81	1,03-3,22	0,040
Uso de CPAP ^c	1,69	0,90-3,12	0,098

^a UCINs = Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal.

^b OR_{ajust} = *Odds Ratio* ajustado por: malformação, número de consultas de pré-natal e gestação múltipla.

^c Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas (*Continuous Positive Airway Pressure*).

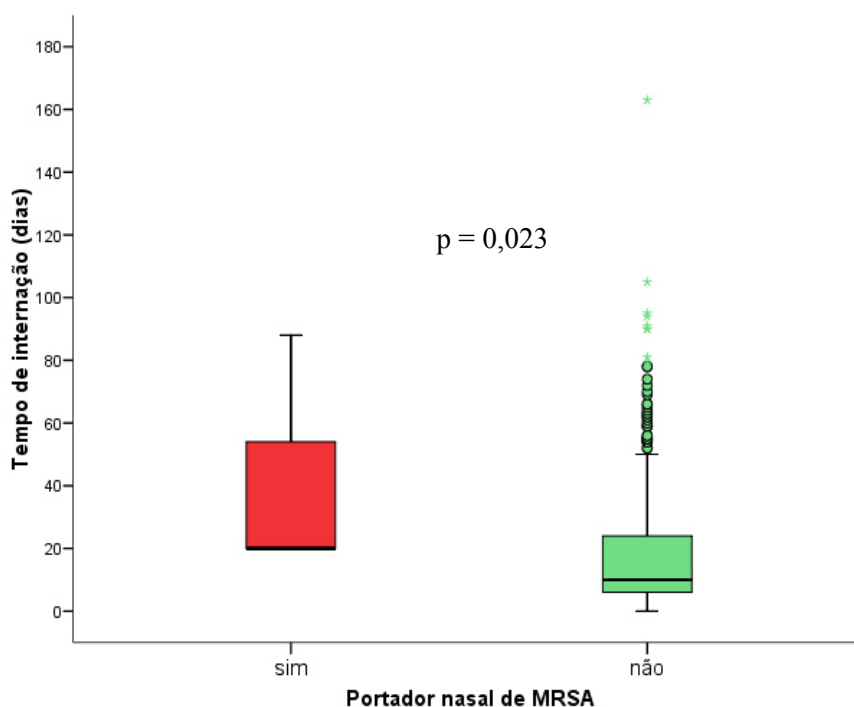


Figura 4. Gráficos-caixa do tempo de internação para casos incidentes de portador nasal de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA). A linha inferior da caixa indica o percentil 25°, a linha superior da caixa indica o percentil 75° e a linha que atravessa a caixa indica a mediana. Os círculos são valores "outliers" do tempo de internação, que variam de 1,5 a 3,0 vezes o intervalo entre os percentis 25° e 75°. Os asteriscos são valores "extreme outliers" do tempo de internação, que são maiores que 3,0 vezes o intervalo entre os percentis 25° e 75°.

Tabela 13. Características clínicas e microbiológicas dos portadores nasais de MRSA internados nas Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal.

CARACTERÍSTICAS	cepa 811	cepa 902	cepa 415	cepa 682
Sexo	fem	masc	fem	masc
SCCmec	IV	III	III	IV
Hospital	Privado A	Privado A	Privado B	Privado B
Dias de hospitalização	88	20	20	4
Tipo de parto	cesáreo	cesáreo	cesáreo	cesáreo
Peso ao nascer (g)	1010	2500	2250	3190
Idade na admissão (horas)	9	3	3	25
Idade na coleta do swab da admissão (horas)	25	6	22	26
MRSA positivo nas primeiras 48 horas de internação	não	não	não	sim
Apgar do 1º minuto	1	3	3	7
Hemocultura (primeiras 48 horas de internação)	negativo	negativo	negativo	negativo
Diagnóstico na admissão	prematuridade membrana hialina pneumonia hemorragia digestiva	prematuridade insuficiência respiratória aguda	prematuridade membrana hialina insuficiência respiratória aguda	insuficiência respiratória aguda
Diagnóstico final	prematuridade distúrbio de coagulação hemorragia intra-peri-ventricular sepse clínica	prematuridade insuficiência respiratória aguda pneumonia sepse clínica	prematuridade membrana hialina insuficiência respiratória aguda comunicação interventricular sepse clínica	insuficiência respiratória aguda cardiopatia congênita sepse clínica

Incidência de S. aureus e MRSA nas UCINs - a incidência de portador de *S. aureus* foi 5,14%. A incidência de MRSA foi 0,50%, variando de 0,26% a 2,44%, mas todos os casos foram detectados apenas nas UCINs de hospitais privados/conveniados (**tabela 14**). Houve uma diferença estatisticamente significativa do tempo de internação entre os neonatos que adquiriram MRSA e os que não adquiriram ($p=0,023$). Observou-se uma associação direta entre tempo de internação em dias e incidência de portador de MRSA. A cada dia de internação aumenta 0,03% (variação de 0,01% a 0,06%) o risco de um neonato vir a ser portador de MRSA ($RR=0,97$; $p=0,04$).

Tabela 14. Incidência de portador de *Staphylococcus aureus* e MRSA^a nas diferentes Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCINs).

UCINs	INCIDÊNCIA					
	<i>S. aureus</i>			MRSA		
	n/total	%	IC 95%	n/total	%	IC 95%
Hospital Materno Infantil	1/62	1,61	0,08-9,83	0/62	0,00	-
Hospital das Clínicas	2/67	2,99	0,52-11,32	0/67	0,00	-
Hospital da Criança	25/392	6,38	4,25-9,39	1/392	0,26	0,01-1,64
Hospital Santa Bárbara	3/82	3,66	0,95-11,06	2/82	2,44	0,42-9,35
TOTAL	31/603	5,14	3,58-7,30	3/603	0,50	0,13-1,57

^a MRSA = *Staphylococcus aureus* metilicilina resistente.

5.3 Perfil de resistência antimicrobiana

Os resultados da CIM para oxacilina mostraram que 16 (3,4%) dos 472 isolados de *S. aureus* foram resistentes à oxacilina, sendo sete do PA e nove de UCIN, totalizando oito crianças (**tabela 15**). Todos os MRSA foram resistentes à oxacilina e cefoxitina e suscetíveis à vancomicina. Resistência à eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim foram detectados em 68,8%, 56,3%, 37,6% e 43,8% dos isolados, respectivamente. Todas as cepas SCCmec tipo III apresentaram perfil MDR e maiores níveis de resistência à oxacilina ($MIC > 256 \mu\text{g/mL}$) em comparação aos SCCmecIV. Todos os isolados foram obtidos pela técnica TSA, exceto a cepa da criança

identificada pelo número 902 (técnica TSB).

Tabela 15. Características fenotípicas e genotípicas das cepas MRSA.

ID	Centro participante		Nº isolados N=16	Técnica do isolamento ^a	SCC _{mec}	MDR ^b	MIC	Resistência a antimicrobianos ^c
936	HMI	PA ^d	2	M+, TSA	III	sim	>256	Oxa Eri Cli Cef Cip SMT Pen
1419	HMI	PA	1	TSA	IV	não	24	Oxa Eri Cli Cef QD Pen
2044	HMI	PA	2	M+, TSA	IV	não	8	Oxa Eri Cli Cef QD Pen
457	HMI	PA	2	M+, TSA	IV	não	24	Oxa Eri Cef SMT Pen
682	HCr	UCIN ^e admissão	3	M+, M-, TSA	IV	não	6	Oxa Cef Tei Pen
		UCIN alta	2	TSA, TSB	IV	não	6	Oxa Cef Tei Pen
811	SB	UCIN alta	1	TSA	IV	não	4	Oxa Eri Cli Cef Cip Pen
415	HCr	UCIN alta	2	M+, TSA	III	sim	>256	Oxa Eri Cli Cef Cip SMT Pen
902	SB	UCIN alta	1	TSB	III	sim	>256	Oxa Eri Cli Cef Cip SMT Pen

^a M+ = manitol positivo; M- = manitol negativo; TSA = *Tripticase Soy Agar*; TSB = *Tripticase Soy Broth*

^b MDR = Multidrogarresistente.

^c Antimicrobianos: Oxacilina (Oxa), Eritromicina (Eri), Cefoxitina (Cef), Clindamicina (Clin), Ciprofloxacina (Cip), Teicoplanina (Tei), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SMT, Quinupristina-Dalfopristina (QD) Penicilina (Pen)

^d Pronto Atendimento

^e Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal

De todos onze isolados MRSA SCC_{mec} tipo IV, seis apresentaram resistência à eritromicina, quatro à clindamicina e dois ao sulfametoxazol-trimetoprim. Dentre os seis MRSA SCC_{mec} tipo IV isolados nas UCINs, um foi resistente à ciprofloxacina e clindamicina e nenhum foi resistente à sulfametoxazol.

O fenótipo MLS_B (macrolídeos, lincosaminas e estreptogaminas) pelo D-teste foi detectado em 22,9% (108/472) dos *S. aureus*, sendo 2,8% (13/472) provenientes das UCINs. Três isolados MRSA SCC_{mec} tipo IV (ID: 1419 e 2044) apresentaram resistência induzida à clindamicina.

5.4 Epidemiologia molecular das cepas MRSA

A análise do perfil de DNA cromossômico de todas as cepas MRSA mostrou três pulsotipos (A, B e C), dois tipos de SCC_{mec} (III e IV) e dois clusters (A e B) com mais de 80% de similaridade genética pelo coeficiente de Dice (**figura 5a**). Os dois clusters com tipos de SCC_{mec} diferentes apresentaram tanto cepas provenientes de UCINs, quanto

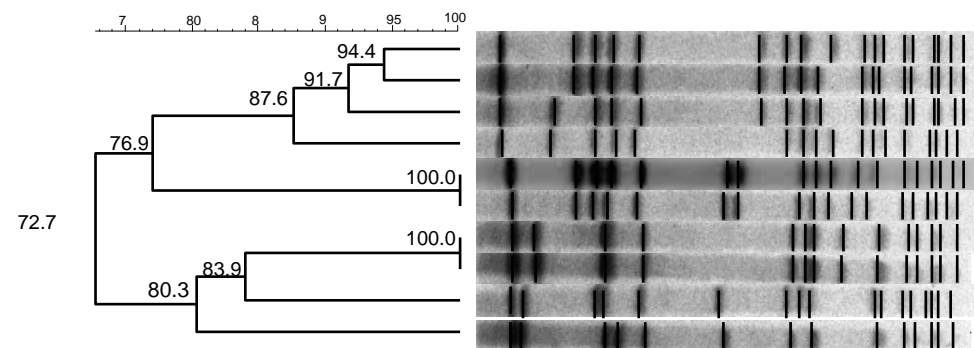
provenientes do PA. Todas as cepas pertencentes ao cluster A portavam SCC*mec* tipo III e compartilhavam >80% de similaridade genética com a cepa controle HU25, representante do clone epidêmico brasileiro. Dessas, duas cepas eram provenientes de UCINs e uma do PA, todas apresentando um perfil de multiresistência (**figura 5a**). Entre as 3 cepas do pulsotipo B, duas foram idênticas entre si, embora provenientes de UCINs diferentes. Estas cepas apresentavam SCC*mec* tipo IV e estavam correlacionadas em mais de 80% com a cepa controle HDE288, representante do clone pediátrico. Nenhuma cepa SCC*mec* tipo IV apresentou perfil de multiresistência. As duas cepas pertencentes ao pulsotipo C eram geneticamente idênticas entre si, eram provenientes do PA, apresentavam SCC*mec* tipo IV e não possuíam perfil de multiresistência.

Em relação às cepas MRSA recuperadas do PA (**figura 5b**), foram observados dois pulsotipos de cepas SCC*mec* tipo IV e um pulsotipo com SCC*mec* tipo III. Entre as cepas SCC*mec* tipo IV, uma compartilhava 84% de similaridade com o clone pediátrico. A única cepa classificada como SCC*mec* tipo III, e compartilhava 86% de similaridade genética com o clone epidêmico brasileiro.

Em relação às cepas MRSA provenientes das UCINs (**figura 5c**), dois pulsotipos foram encontrados. O pulsotipo B constituiu-se de três cepas geneticamente idênticas, apesar de serem provenientes de duas UCINs diferentes. Esse pulsotipo apresentou 84% de similaridade genética com o clone pediátrico e portavam SCC*mec* IV. Um recém-nascido (ID 682) colonizado na admissão com SCC*mec*IV, apresentou o mesmo organismo na alta. Outro neonato (ID 811) foi colonizado durante a internação. O pulsotipo A foi associado ao clone brasileiro (88,6% de similaridade), portava SCC*mec* III, pertencia a neonatos de duas UCINs diferentes e as cepas foram adquiridas durante a internação.

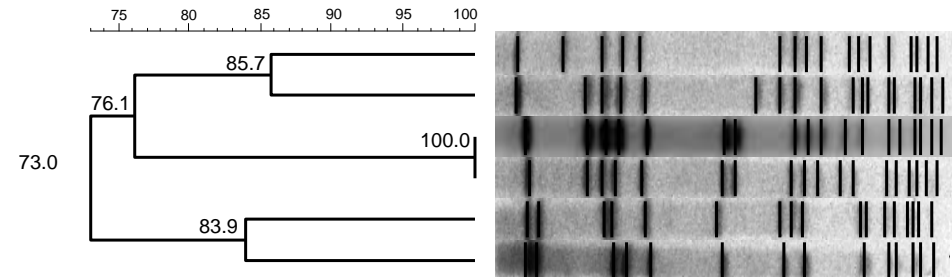
Nenhuma dos isolados que apresentaram SCC*mec* tipo IV tinha o gene codificador de PVL.

a) PA e UCINs



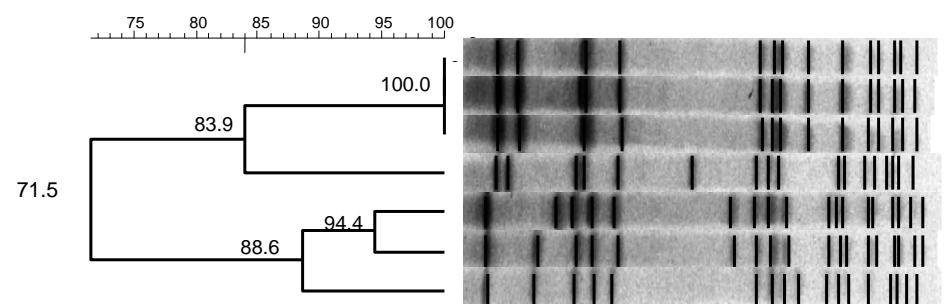
ID	Centro participante	PFGE	SCCmec	MIC	MDR	Sexo	Idade
936	HMI PA	A1	III	>256	sim	F	10 m
902	SB UCIN	A2	III	>256	sim	M	0 d
415	HCr UCIN	A3	III	>256	sim	F	0 d
HU25*	NA NA	A	III		NA	NA	NA
1419	HMI PA	C	IV	24	não	M	1 m
2044	HMI PA	C	IV	8	não	M	13 m
682	HCr UCIN	B1	IV	16	não	M	1 d
811	SB UCIN	B1	IV	16	não	F	0 d
HDE288**	NA NA	B	IV		NA	NA	NA
457	HMI PA	B2	IV	24	não	F	35 m

b) PA



ID	PFGE	SCCmec	Creche nos últimos 6m	Malformação	Trabalhador da saúde	Antibiótico nos últimos 3m	Internação nos últimos 6m
HU25*	A	III	NA	NA	NA	NA	NA
936 M+	A1	III	sim	não	não	não	sim
1419TSA	C	IV	não	não	não	não	sim
2044 M+	C	IV	sim	sim	não	não	sim
HDE288**	B	IV	NA	NA	NA	NA	NA
457	B1	IV	sim	sim	não	sim	sim

c) UCINs



ID	Centro participante	PFGE	SCCmec	Idade admissão (horas)	Tempo de internação (dias)	Malformação	Pré-termo	Peso ao nascer (gramas)
682	HCr adm	B1	IV	25	4	sim	não	3190
682	HCr alta	B1	IV	25	4	sim	não	3190
811	SB alta	B1	IV	9	88	não	sim	1010
HDE288**	NA NA	B	IV	NA***	NA	NA	NA	NA
902	SB alta	A1	III	3	20	não	sim	2500
415	HCr alta	A2	III	3	20	não	sim	2250
HU25*	NA NA	A	III	NA	NA	NA	NA	NA

Figura 5. Similaridade genética de cepas MRSA de crianças de Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN) e Pronto Atendimento (PA). Características epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas de crianças de UCIN e PA **(a)**; Características genotípicas e fatores de risco para MRSA de crianças atendidas em PA **(b)** e em UCIN **(c)**. *representante do clone epidêmico brasileiro; ** representante do clone pediátrico; ***NA= não se aplica

Dentre os isolados MRSA avaliados pelo MLST e pelo *spa type*, encontrou-se ST770, ST585 e um ST não registrado no servidor do MLST, todos com *spa type* t037 e relacionados com o clone epidêmico brasileiro (**tabela 16**). Quatro cepas *spa types* foram encontradas, sendo duas representantes do clone pediátrico, uma representante do clone brasileiro e uma representante do clone Western Australia.

Tabela 16. Parentesco genético entre cepas de portador nasal de MRSA isoladas de neonatos de UCINs e de crianças atendidas em serviços de pronto atendimento de Goiânia.

ID	SCCmec	Similaridade PFGE ^a	Local	Número do alelo do MLST ^b							ST ^c	<i>Spa type</i>	Clones relacionados ^d
				<i>arc</i>	<i>aro</i>	<i>glp</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>ygil</i>			
415	III	87,6%	UCIN ^e	1	3	1	1	4	4	3	770	t037	<i>single locus</i> variante do clone brasileiro
902	III		UCIN	2	1	1	1	4	4	3	585	t037	<i>single locus</i> variante do clone brasileiro
936	III		PA ^f	2	3	1	88	1	4	3	novo ^g	t037	<i>double locus</i> variante do clone brasileiro
457	IV	80,3%	UCIN	1	4	1	4	12	1	10	5	t002	clone pediátrico
682	IV		UCIN	1	4	1	4	12	1	10	5	t045	clone pediátrico
811	IV		PA	1	31	1	4	12	1	10	641	-	<i>single locus</i> variante do clone pediátrico
1419	IV	100,0%	PA	1	1	1	1	1	1	1	1	t128	clone Western Austrália ^h
2044	IV		PA	1	1	1	1	1	1	3	1	-	clone Western Austrália

^a PFGE=Pulsed Field Gel Electrophoresis

^b MLST=Multi Locus Sequence Type

^c ST=Sequence type

^d cepas relacionadas ao ST encontrados e que constam na base de dados do servidor MLST net

^e Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal

^f Pronto atendimento

^g submetido ao servidor do MLST net para ser alocado um novo ST

^h WA-Australia - Western Australia MRSA

- seqüenciamento em revisão

6 DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou a presença de portadores nasais MRSA em Pronto Atendimento e em Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal de Goiânia, identificou fatores associados ao portador nasal de *S. aureus* e MRSA e descreveu a epidemiologia molecular dos isolados MRSA.

As prevalências de portador nasal de MRSA no PA e nas UCINs foram inferiores às observadas em crianças asiáticas (Huang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Rijal *et al.*, 2008) e similares às norte-americanas (Hussain *et al.*, 2001; Gregory *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

No PA, pode-se verificar que crianças com malformação e as que possuíam alguém da família que freqüentaram creche apresentaram mais chance de colonização nasal por MRSA. Uma explicação plausível para creche ter sido identificada como um potencial fator de risco para portador de MRSA é que ambientes aglomerados podem favorecer a disseminação de bactérias em crianças colonizadas, como já descrito para o *S. pneumoniae* (Franco *et al.*, 2010). Nossos resultados corroboram com os da investigação conduzida em creches de Goiânia (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2009) em que se detectou prevalência de MRSA significativamente maior (1,2%) do que a prevalência detectada neste estudo no PA (0,2%). Malformação como fator associado ao portador de MRSA pode indicar maior consumo de antimicrobianos com seleção de cepas resistentes.

Nas UCINs não encontramos fatores de risco sabidamente associados à MRSA, tais como baixo peso, idade gestacional, uso de antimicrobianos, uso de cateter ou uso de ventilador (Khoury *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006). Em nosso estudo, o risco de colonização por MRSA foi maior nos hospitais privados e para neonatos com maior tempo de internação. Todavia, os hospitais públicos apresentaram maior tempo de internação dos recém-nascidos (dados não mostrados). Este achado aparentemente paradoxal aponta para uma possível diferença na qualidade da assistência neonatal entre os hospitais públicos e privados de Goiânia. Neste município, os hospitais públicos apresentam proporções mais adequadas enfermeiro:paciente e dispõem de Comissões de Controle de Infecção

Hospitalar mais bem estruturadas, com equipe multidisciplinar com atuação ativa e contínua. A vigilância em saúde representa uma parte importante do monitoramento da qualidade da assistência à saúde em seu sentido amplo, não apenas assistencial. Nesse sentido, a incorporação de critérios epidemiológicos pelos serviços de saúde, bem como a implementação de protocolos em UCINs de Goiânia, ainda constituem um desafio para o controle e prevenção de microrganismos multirresistentes.

Neste estudo não se detectou nenhum clone dominante. A tipagem molecular dos isolados MRSA revelaram três clones internacionais, dos quais dois eram HA-MRSA, mas encontrados no PA e nas UCINs: um relacionado geneticamente ao clone brasileiro e outro ao clone pediátrico. O terceiro clone internacional encontrado somente no PA foi o CA-MRSA Western Australia -1/USA400.

O CA-MRSA pertencente ao clone australiano Western Austrália (WA-1/USA400; ST1-IV) foi detectado pela primeira vez na Região Centro-Oeste brasileira. Clones dessa linhagem foram encontrados predominantemente na Austrália, causando surto em pacientes internados (O'Brien *et al.*, 1999). Nos Estados Unidos foram detectadas infecções graves, algumas delas fatais (CDC, 1999; McDougal *et al.*, 2003). No Brasil, foram identificadas cepas desse clone em pacientes das cidades de Porto Alegre e Rio de Janeiro (Ribeiro *et al.*, 2007) e em recém-nascidos de unidade neonatal em São Paulo (Inoue, 2008). Assim, é plausível supor que o clone australiano WA-1 possa estar disseminado em outras regiões do país. Embora incomum, as duas cepas WA-1 deste estudo não apresentaram PVL, similarmente a outros relatos na literatura (O'Brien *et al.*, 2004; Nimmo *et al.*, 2006). Cepas CA-MRSA identificadas em portadores pediátricos de Goiânia foram relacionadas ao clone WA-1, no PA no presente estudo, e ao clone Oceania Southwest Pacific, OSPC (MRSA SCCmecIV-ST30), em creches (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2009). Casos graves de infecções por CA-MRSA relacionados à linhagem OSPC foram descritos recentemente em Porto Alegre (Rozenbaum *et al.*, 2009; Scribel *et al.*, 2009).

Em outras três crianças (duas de unidades neonatais e uma do PA) foram isoladas cepas MRSA pertencentes ao clone pediátrico/USA800 (ST5-IV). O clone pediátrico encontrado em UCINs foi detectado na admissão de um neonato e no decorrer da internação de outra criança. Atualmente, esse clone é responsável por infecções relacionadas ao ambiente hospitalar em vários países (Andrade, 2008; Deurenberg e Stobberingh, 2009), incluindo o Brasil (Melo *et al.*, 2004; de *et al.*, 2005; de Miranda *et*

al., 2007; Scribel *et al.*, 2009; Sousa-Junior *et al.*, 2009). O clone pediátrico é encontrado principalmente em populações jovens e de menor idade (Sa-Leao *et al.*, 1999; Andrade, 2008). Segundo investigadores portugueses, esse fato se explicaria pela política mais rigorosa no uso de antimicrobianos em unidades de cuidados intensivos pediátricos e neonatais, com baixa rotatividade de pacientes, o que permitiria a manutenção do clone pediátrico nesses ambientes (Sa-Leao *et al.*, 1999). Recentemente, outros estudos descreveram infecções pelo clone pediátrico em adultos debilitados e idosos do Recife, Rio de Janeiro e Natal (Rozenbaum *et al.*, 2006; de Miranda *et al.*, 2007; Sousa-Junior *et al.*, 2009) e em trabalhadores da saúde do Rio Janeiro (Melo *et al.*, 2004). Ao se estabelecer no ambiente hospitalar, o tipo IV adquire potencial para concorrer com outros clones endêmicos de HA-MRSA, devido à maior mobilidade, virulência e transmissibilidade, colocando-o em vantagem na disseminação e expansão de reservatórios (Grundmann *et al.*, 2006). Outra característica, que coloca o clone pediátrico como um importante patógeno hospitalar internacional é o fenótipo não multirresistente. A relação entre padrões genéticos e amplo espectro de susceptibilidade antimicrobiana aumenta a capacidade de crescimento do clone pediátrico (Laurent *et al.*, 2001; Okuma *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003).

Chama a atenção, a cepa MRSA SCC*mecIV* relacionada ao clone pediátrico, isolada de uma criança atendida no Pronto Atendimento, similarmente ao encontrado em Açores (Conceicao *et al.*, 2010). O fato dessa criança apresentar fatores de riscos clássicos associados aos serviços de saúde (pneumonia e hospitalização nos últimos seis meses, malformação e uso de antibiótico), pode indicar aquisição do clone pediátrico no ambiente hospitalar, posterior introdução na comunidade e com possibilidade de se disseminar em nível local.

O terceiro clone internacional identificado entre as cepas MRSA isoladas no PA e nas UCINs foi o clone epidêmico brasileiro (SCC*mecIII-A*). Estudos anteriores realizados em Goiânia já mostravam crianças em creches e as admitidas em hospitais portando SCC*mecIII-A* (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2007; Lamaro-Cardoso *et al.*, 2009). Todavia, este é o primeiro estudo que identificou o clone epidêmico brasileiro em UCINs de Goiânia. Uma criança do PA apresentava fatores de risco sabidamente associados ao ambiente hospitalar, como história de internação (Lu *et al.*, 2005), uso de antibiótico nos últimos seis meses (Lee *et al.*, 2009), baixo nível socioeconômico (Fritz *et al.*, 2008), frequência à creche e ter tido alguém da família internado nos últimos seis meses. Nos hospitais de outros países, o

clone epidêmico brasileiro vem sendo substituído por outras linhagens clonais, com perfis fenotípicos mais sensíveis (Sola *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2007). Nossos achados confirmam que este clone ainda persiste nos ambientes de saúde brasileiros (Amaral *et al.*, 2005; Vivoni *et al.*, 2006; Andrade, 2008) e na comunidade (Lamaro-Cardoso *et al.*, 2007). A persistência desse clone em hospitais deve-se à sua capacidade para produção de biofilme e invasão de células epiteliais das vias aéreas (de Miranda *et al.*, 2007). Similarmente a outros estudos (Teixeira *et al.*, 1995; Vivoni *et al.*, 2006; Lamaro-Cardoso *et al.*, 2007), todos os isolados MRSA SCCmecIII identificados no presente trabalho foram multi-droga resistentes.

Por meio de ferramentas moleculares foi possível identificar que duas cepas HA-MRSA SCCmec tipo IV das UCINs apresentavam 100% de similaridade entre si, eram de crianças hospitalizadas em dois hospitais privados, e apresentavam mais de 80% de similaridade com uma cepa SCCmec tipo IV isolada no PA de um hospital público.

As duas cepas MRSA com genótipo SCCmec tipo III foram isoladas de dois outros neonatos hospitalizados nos mesmos hospitais privados, tinham mais de 90% de similaridade entre si e com uma cepa SCCmec tipo III isolada no PA.

Este estudo sugere a ocorrência de transmissão cruzada entre os diferentes serviços, uma vez que identificou portadores de MRSA SCCmec tipos III e IV, similares geneticamente aos clones brasileiro e pediátrico, respectivamente, tanto em crianças hospitalizadas quanto em crianças atendidas em PA. A transmissão cruzada de MRSA nas UCINs pode ter ocorrido por meio dos profissionais de saúde (Creech *et al.*, 2005; Regev-Yochay *et al.*, 2005; Bertin *et al.*, 2006), uma vez que, durante a coleta de dados, observamos profissionais de saúde que trabalhavam em mais de uma UCIN participante do estudo, inclusive nos dois hospitais privados. Assim, seria interessante a promoção das boas práticas, na prevenção da transmissão cruzada, para os profissionais da saúde. Outras rotas de transmissão identificadas por outros investigadores podem existir como a de neonatos transferidos de outros hospitais (Saiman *et al.*, 2003).

Várias estratégias têm sido propostas para vigilância, controle e prevenção da infecção e colonização por MRSA nas instituições de saúde. No entanto, cada hospital segue uma orientação, pois há diferentes opiniões sobre a melhor abordagem e, além disso, as estratégias de contenção do MRSA são tipicamente baseadas em experiências de surtos, em vez da prevenção ou minimização da sua disseminação endêmica (Muto *et al.*, 2003;

Coia *et al.*, 2006; Loveday *et al.*, 2006; Larson *et al.*, 2010). Neste estudo, após a identificação de neonatos colonizados nas UCINs, esses serviços instituíram o uso de antimicrobianos de maneira mais criteriosa e reforçaram a aderência à higiene das mãos.

Um dos pontos fortes do estudo foi o Procedimento Operacional Padrão utilizado para o isolamento do MRSA, que contou com três testes para triagem (ágar manitol, ágar TSA e caldo TSB). Esta estratégia metodológica minimizou subestimativas da prevalência de MRSA. O incremento da sensibilidade das técnicas para isolamento de MRSA é de fundamental importância para a detecção de indivíduos ou grupos de alto risco e particularmente útil para o monitoramento do portador de MRSA (Lee *et al.*, 2007). Dentre as limitações do presente estudo, deve-se mencionar que o pequeno número de isolados MRSA pode ter limitado a identificação de potenciais fatores de risco. É importante salientar que a prevalência e fatores de risco variam regionalmente e que os clínicos devem considerar o cenário local para a tomada de decisões.

A epidemiologia do MRSA apresenta um processo dinâmico e, atualmente, discute-se a imprecisão de limites entre a comunidade e o ambiente hospitalar. Cepas de MRSA associadas aos serviços de saúde têm sido identificadas na comunidade (Charlebois *et al.*, 2002; Lamaro-Cardoso *et al.*, 2007; Ozaki *et al.*, 2009) e nossos resultados corroboram essa tendência. Clones tipicamente comunitários também estão envolvidos em surtos hospitalares (David *et al.*, 2006; Otter e French, 2006). Assim, tanto o HA-MRSA pode ter um “reservatório oculto” na comunidade, como o CA-MRSA em serviços de saúde, aumentando a necessidade de monitorar a tendência epidemiológica do MRSA usando ferramentas moleculares.

7 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu identificar a prevalência e os fatores de risco de crianças e neonatos portadores nasais de *S. aureus* e MRSA, analisar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e, identificar três diferentes linhagens de clones internacionais no Pronto Atendimento pediátrico e nas Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal. O estudo adicionou as seguintes evidências:

- ✓ A prevalência de *S. aureus* e MRSA foi, respectivamente, de 20,1% e 0,2% no PA e de 9,1% e 0,6% nas UCINs.
- ✓ Freqüentar creche e malformação congênita foram independentemente associadas ao portador nasal para MRSA em Pronto Atendimento pediátrico.
- ✓ A colonização nasal por MRSA foi encontrada apenas em hospitais privados e foi diretamente associada ao tempo de internação, apesar da média do tempo de internação ter sido maior nas UCINs dos hospitais públicos.
- ✓ Três linhagens genótípicas predominantes foram detectadas: (i) clone epidêmico brasileiro (HA-MRSA, SCCmec tipo III) nas UCINs e no PA; (ii) clone pediátrico (HA-MRSA, SCCmec tipo IV) nas UCINs e no PA; (iii) clone Western Australia / USA 400 (CA-MRSA, SCCmec IV) no PA.
- ✓ Foi identificada pela primeira vez na região Centro-Oeste a presença de cepas CA-MRSA no PA geneticamente relacionadas ao clone Western Australia, todas resistentes à eritromicina e clindamicina.
- ✓ O clone pediátrico encontrado em UCINs foi detectado na admissão de um neonato e no decorrer da internação em outra criança. Também foi identificada uma cepa relacionada ao clone pediátrico no PA.
- ✓ Tanto no PA quanto nas UCINs foram encontradas cepas MRSA relacionadas ao clone epidêmico brasileiro, todas multi-droga resistentes.

REFERÊNCIAS

AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYE, K.; DE LENCASTRE, H.; DEPLANO, A.; ENRIGHT, M. C.; ETIENNE, J.; FRIEDRICH, A.; HARMSSEN, D.; HOLMES, A.; HUIJSDENS, X. W.; KEARNS, A. M.; MELLMANN, A.; MEUGNIER, H.; RASHEED, J. K.; SPALBURG, E.; STROMMENDER, B.; STRUELENS, M. J.; TENOVER, F. C.; THOMAS, J.; VOGEL, U.; WESTH, H.; XU, J. e WITTE, W. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol*, v.44, n.2, Feb, p.619-621. 2006.

AIRES DE SOUSA, M.; CONCEICAO, T.; SIMAS, C. e DE LENCASTRE, H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol*, v.43, n.10, Oct, p.5150-5157. 2005.

AIRES DE SOUSA, M.; DE LENCASTRE, H.; SANTOS SANCHES, I.; KIKUCHI, K.; TOTSUKA, K. e TOMASZ, A. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb Drug Resist*, v.6, n.3, Fall, p.253-258. 2000.

AIRES DE SOUSA, M.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; AVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S. T.; BRANDILEONE, M. C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, M. E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANO-SANTOS, F.; HEITMANN, I. e DE LENCASTRE, H. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol*, v.39, n.6, Jun, p.2197-2205. 2001.

AL REYAMI, E.; AL ZOABI, K.; RAHMANI, A.; TAMIM, M. e CHEDID, F. Is isolation of outborn infants required at admission to the neonatal intensive care unit? *Am J Infect Control*, v.37, n.4, May, p.335-337. 2009.

AMARAL, M. M.; COELHO, L. R.; FLORES, R. P.; SOUZA, R. R.; SILVA-CARVALHO, M. C.; TEIXEIRA, L. A.; FERREIRA-CARVALHO, B. T. e FIGUEIREDO, A. M. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J Infect Dis*, v.192, n.5, Sep 1, p.801-810. 2005.

AMORIM, M. L.; FARIA, N. A.; OLIVEIRA, D. C.; VASCONCELOS, C.; CABEDA, J. C.; MENDES, A. C.; CALADO, E.; CASTRO, A. P.; RAMOS, M. H.; AMORIM, J. M. e DE LENCASTRE, H. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-

15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J Clin Microbiol*, v.45, n.9, Sep, p.2881-2888. 2007.

ANDRADE, S. S. *Epidemiologia molecular de Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina isolados na Argentina, Brasil e Chile, no período de 1997 a 2006*. (tese de doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2008. 87 p.

APPELBAUM, P. C. MRSA--the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect*, v.12 Suppl 2, Apr, p.3-10. 2006.

AZAP, O. K.; ARSLAN, H.; TIMURKAYNAK, F.; YAPAR, G.; ORUC, E. e GAGIR, U. Incidence of inducible clindamycin resistance in staphylococci: first results from Turkey. *Clin Microbiol Infect*, v.11, n.7, Jul, p.582-584. 2005.

BANNERMAN, T. L. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically. *Manual of clinical microbiology*, v.1, p.384-404. 2003.

BEESTON, C. J.; GUPTA, R.; CHADWICK, P. R. e YOUNG, R. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia and mortality in a teaching hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.28, n.6, Jun, p.585-590. 2009.

BERTIN, M. L.; VINSKI, J.; SCHMITT, S.; SABELLA, C.; DANZIGER-ISAKOV, L.; MCHUGH, M.; PROCOP, G. W.; HALL, G.; GORDON, S. M. e GOLDFARB, J. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in a neonatal intensive care unit epidemiologically linked to a healthcare worker with chronic otitis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.27, n.6, Jun, p.581-585. 2006.

BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J. e JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.50, n.1, Sep, p.59-69. 2004.

BLOMBERG, B.; MANJI, K. P.; URASSA, W. K.; TAMIM, B. S.; MWAKAGILE, D. S.; JUREEN, R.; MSANGI, V.; TELLEVIK, M. G.; HOLBERG-PETERSEN, M.; HARTHUG, S.; MASELLE, S. Y. e LANGELAND, N. Antimicrobial resistance predicts death in Tanzanian children with bloodstream infections: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis*, v.7, p.43. 2007.

BOYCE, J. M.; COOKSON, B.; CHRISTIANSEN, K.; HORI, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; KOCAGOZ, S.; OZTOP, A. Y.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; HARBARTH, S. e PITTET, D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*, v.5, n.10, Oct, p.653-663. 2005.

BOYLE-VAVRA, S. e DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest*, v.87, n.1, Jan, p.3-9. 2007.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S. e MORSE, S. A. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

BROWN, D. F.; EDWARDS, D. I.; HAWKEY, P. M.; MORRISON, D.; RIDGWAY, G. L.; TOWNER, K. J. e WREN, M. W. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*, v.56, n.6, Dec, p.1000-1018. 2005.

BRUMFITT, W. e HAMILTON-MILLER, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, v.320, n.18, May 4, p.1188-1196. 1989.

CARRICO, J. A.; PINTO, F. R.; SIMAS, C.; NUNES, S.; SOUSA, N. G.; FRAZAO, N.; DE LENCASTRE, H. e ALMEIDA, J. S. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, v.43, n.11, Nov, p.5483-5490. 2005.

CARS, O.; HOGBERG, L. D.; MURRAY, M.; NORDBERG, O.; SIVARAMAN, S.; LUNDBORG, C. S.; SO, A. D. e TOMSON, G. Meeting the challenge of antibiotic resistance. *BMJ*, v.337, p.a1438. 2008.

CDC. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA*, v.282, n.12, Sep 22-29, p.1123-1125. 1999.

_____. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among competitive sports participants--Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles County, 2000-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v.52, n.33, Aug 22, p.793-795. 2003.

CEPEDA, J. A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; HAYMAN, S.; COOKSON, B.; SHAW, S.; KIBBLER, C.; SINGER, M.; BELLINGAN, G. e WILSON, A. P. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. *Lancet*, v.365, n.9456, Jan 22-28, p.295-304. 2005.

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

_____. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*, v.7, n.2, Mar-Apr, p.178-182. 2001.

CHARLEBOIS, E. D.; BANGSBERG, D. R.; MOSS, N. J.; MOORE, M. R.; MOSS, A. R.; CHAMBERS, H. F. e PERDREAU-REMGTON, F. Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin Infect Dis*, v.34, n.4, Feb 15, p.425-433. 2002.

CHEN, L.; MEDIAVILLA, J. R.; OLIVEIRA, D. C.; WILLEY, B. M.; DE LENCASTRE, H. e KREISWIRTH, B. N. Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome mec typing. *J Clin Microbiol*, v.47, n.11, Nov, p.3692-3706. 2009.

CHUNG, M.; DE LENCASTRE, H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A.; ADAMSSON, I.; AIRES DE SOUSA, M.; CAMOU, T.; COCUZZA, C.; CORSO, A.; COUTO, I;

DOMINGUEZ, A.; GNIADKOWSKI, M.; GOERING, R.; GOMES, A.; KIKUCHI, K.; MARCHESE, A.; MATO, R.; MELTER, O.; OLIVEIRA, D.; PALACIO, R.; SA-LEAO, R.; SANTOS SANCHES, I.; SONG, J. H.; TASSIOS, P. T. e VILLARI, P. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*, v.6, n.3, Fall, p.189-198. 2000.

CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 16th informational supplement M100-S17*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2007.

COIA, J. E.; DUCKWORTH, G. J.; EDWARDS, D. I.; FARRINGTON, M.; FRY, C.; HUMPHREYS, H.; MALLAGHAN, C. e TUCKER, D. R. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect*, v.63 Suppl 1, May, p.S1-44. 2006.

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

COOKSON, B. D.; ROBINSON, D. A.; MONK, A. B.; MURCHAN, S.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M. J.; SCHEEL, C.; FUSSING, V.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; CUNY, C.; WITTE, W.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VINDEL, A.; GARAIZAR, J.; HAEGGMAN, S.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RANSJO, U.; MULLER-PREMUR, M.; HRYNIEWICZ, W.; ROSSNEY, A.; O'CONNELL, B.; SHORT, B. D.; THOMAS, J.; O'HANLON, S. e ENRIGHT, M. C. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol*, v.45, n.6, Jun, p.1830-1837. 2007.

CRAWFORD, S. E. e DAUM, R. S. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: modern times for an ancient pathogen. *Pediatr Infect Dis J*, v.24, n.5, May, p.459-460. 2005.

CREECH, C. B., 2ND; KERNODLE, D. S.; ALSENTZER, A.; WILSON, C. e EDWARDS, K. M. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Pediatr Infect Dis J*, v.24, n.7, Jul, p.617-621. 2005.

DAUWALDER, O.; LINA, G.; DURAND, G.; BES, M.; MEUGNIER, H.; JARLIER, V.; COIGNARD, B.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. e LAURENT, F. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*, v.46, n.10, Oct, p.3454-3458. 2008.

DAVID, M. D.; KEARNS, A. M.; GOSSAIN, S.; GANNER, M. e HOLMES, A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect*, v.64, n.3, Nov, p.244-250. 2006.

DAVIS, K. A.; STEWART, J. J.; CROUCH, H. K.; FLOREZ, C. E. e HOSPENTHAL, D. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis*, v.39, n.6, Sep 15, p.776-782. 2004.

DE ALMEIDA SILVA, H.; STEFFEN ABDALLAH, V. O.; CARNEIRO, C. L. e GONTIJO, P. P. Infection and colonization by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. *Braz J Infect Dis*, v.7, n.6, Dec, p.381-386. 2003.

DE, A. T. P.; PACHECO, R. L.; COSTA, S. F.; ROSSI, F.; BARONE, A. A.; MAMIZUKA, E. M. e LEVIN, A. S. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v.43, n.7, Jul, p.3435-3437. 2005.

DE MIRANDA, O. P.; SILVA-CARVALHO, M. C.; RIBEIRO, A.; PORTELA, F.; CORDEIRO, R. P.; CAETANO, N.; VIDAL, C. F. e FIGUEIREDO, A. M. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect*, v.13, n.12, Dec, p.1165-1172. 2007.

DERESINSKI, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis*, v.40, n.4, Feb 15, p.562-573. 2005.

DEURENBERG, R. H. e STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med*, v.9, n.2, Mar, p.100-115. 2009.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, v.26, p.297-302. 1945.

DOMINGUEZ, M. A.; DE LENCASTRE, H.; LINARES, J. e TOMASZ, A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol*, v.32, n.9, Sep, p.2081-2087. 1994.

DRINKOVIC, D.; FULLER, E. R.; SHORE, K. P.; HOLLAND, D. J. e ELLIS-PEGLER, R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother*, v.48, n.2, Aug, p.315-316. 2001.

DUCK, W. M.; STEWARD, C. D.; BANERJEE, S. N.; MCGOWAN, J. E., JR. e TENOVER, F. C. Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J Clin Microbiol*, v.41, n.7, Jul, p.3035-3042. 2003.

ENRIGHT, M. C.; DAY, N. P.; DAVIES, C. E.; PEACOCK, S. J. e SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v.38, n.3, Mar, p.1008-1015. 2000.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H. e SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.11, May 28, p.7687-7692. 2002.

FARRINGTON, M.; TRUNDLE, C.; REDPATH, C. e ANDERSON, L. Effects on nursing workload of different methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) control strategies. *J Hosp Infect*, v.46, n.2, Oct, p.118-122. 2000.

FERGIE, J. E. e PURCELL, K. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in south Texas children. *Pediatr Infect Dis J*, v.20, n.9, Sep, p.860-863. 2001.

FITZPATRICK, F.; ROCHE, F.; CUNNEY, R. e HUMPHREYS, H. Challenges of implementing national guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization or infection in acute care hospitals in the Republic of Ireland. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.30, n.3, Mar, p.277-281. 2009.

FRANCO, C. M.; ANDRADE, A. L.; ANDRADE, J. G.; ALMEIDA E SILVA, S.; OLIVEIRA, C. R.; PIMENTA, F. C.; LAMARO-CARDOSO, J.; BRANDAO, A. P.; ALMEIDA, S. C.; CALIX, J. J.; NAHM, M. H. e DE CUNTO BRANDILEONE, M. C. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*, v.29, n.1, Jan, p.77-79. 2010.

FRITZ, S. A.; GARBUTT, J.; ELWARD, A.; SHANNON, W. e STORCH, G. A. Prevalence of and risk factors for community-acquired methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* colonization in children seen in a practice-based research network. *Pediatrics*, v.121, n.6, Jun, p.1090-1098. 2008.

GEHA, D. J.; UHL, J. R.; GUSTAFERRO, C. A. e PERSING, D. H. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *staphylococci* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, v.32, n.7, Jul, p.1768-1772. 1994.

GOMES, A. R.; SANCHES, I. S.; AIRES DE SOUSA, M.; CASTANEDA, E. e DE LENCASTRE, H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microb Drug Resist*, v.7, n.1, Spring, p.23-32. 2001.

GORWITZ, R. J.; KRUSZON-MORAN, D.; MCALLISTER, S. K.; MCQUILLAN, G.; MCDUGAL, L. K.; FOSHEIM, G. E.; JENSEN, B. J.; KILLGORE, G.; TENOVER, F. C. e KUEHNERT, M. J. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis*, v.197, n.9, May 1, p.1226-1234. 2008.

GRAHAM, P. L., 3RD; LIN, S. X. e LARSON, E. L. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med*, v.144, n.5, Mar 7, p.318-325. 2006.

GREGORY, M. L.; EICHENWALD, E. C. e PUOPOLO, K. M. Seven-year experience with a surveillance program to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

colonization in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics*, v.123, n.5, May, p.e790-796. 2009.

GRUNDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYCE, J. e TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*, v.368, n.9538, Sep 2, p.874-885. 2006.

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

GUILARDE, A. O.; TURCHI, M. D.; MARTELLI, C. M.; PRIMO, M. G. e DE ABREU BATISTA, L. J. [Bacteremias at a teaching hospital: etiology, antimicrobial susceptibility pattern and risk factors for mortality]. *Rev Assoc Med Bras*, v.53, n.1, Jan-Feb, p.34-38. 2007.

HANSEN, A. M. e ERICSON SOLLID, J. U. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.46, n.1, Feb, p.8-20. 2006.

HARBARTH, S.; ALBRICH, W.; GOLDMANN, D. A. e HUEBNER, J. Control of multiply resistant cocci: do international comparisons help? *Lancet Infect Dis*, v.1, n.4, Nov, p.251-261. 2001.

HARMSSEN, D.; CLAUS, H.; WITTE, W.; ROTHGANGER, J.; TURNWALD, D. e VOGEL, U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*, v.41, n.12, Dec, p.5442-5448. 2003.

HEALY, C. M.; HULTEN, K. G.; PALAZZI, D. L.; CAMPBELL, J. R. e BAKER, C. J. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis*, v.39, n.10, Nov 15, p.1460-1466. 2004.

HEROLD, B. C.; IMMERGLUCK, L. C.; MARANAN, M. C.; LAUDERDALE, D. S.; GASKIN, R. E.; BOYLE-VAVRA, S.; LEITCH, C. D. e DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*, v.279, n.8, Feb 25, p.593-598. 1998.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H. e ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, v.292, n.2, Jul, p.67-74. 2002.

HITOMI, S.; KUBOTA, M.; MORI, N.; BABA, S.; YANO, H.; OKUZUMI, K. e KIMURA, S. Control of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit by unselective use of nasal mupirocin ointment. *J Hosp Infect*, v.46, n.2, Oct, p.123-129. 2000.

HOSMER, D. W. e LEMESHOW, S. Multiple logistic regression. In: D. W. Hosmer e S. Lemeshow (Ed.). *Applied logistic regression*. New York: John Wiley, 2000. Multiple logistic regression, p.31-44.

HUANG, Y. C.; CHOU, Y. H.; SU, L. H.; LIEN, R. I. e LIN, T. Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and its association with infection among infants hospitalized in neonatal intensive care units. *Pediatrics*, v.118, n.2, Aug, p.469-474. 2006.

HUANG, Y. C.; HWANG, K. P.; CHEN, P. Y.; CHEN, C. J. e LIN, T. Y. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among Taiwanese children in 2005 and 2006. *J Clin Microbiol*, v.45, n.12, Dec, p.3992-3995. 2007.

HUSSAIN, F. M.; BOYLE-VAVRA, S.; BETHEL, C. D. e DAUM, R. S. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. *Pediatr Infect Dis J*, v.19, n.12, Dec, p.1163-1166. 2000.

HUSSAIN, F. M.; BOYLE-VAVRA, S. e DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic. *Pediatr Infect Dis J*, v.20, n.8, Aug, p.763-767. 2001.

INOUE, F. M. *Infecções da corrente sanguínea por Staphylococcus aureus resistentes a oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores de risco e diversidade genética.* (dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2008. 79 p.

IRVING, W. L.; BOSWELL, T. e ALA'ALDEEN, D. *Medical microbiology.* New York: Taylor & Francis Group. 2005. 350 p.

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

JEVONS, M. P. "Celbenin" - resistant staphylococci. *Br Med J*, v.1, p.124-125. 1961.

JONAS, D.; GRUNDMANN, H.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F. D. e TOWNER, K. J. Evaluation of the mecA femB duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.18, n.9, Sep, p.643-647. 1999.

JORGENSEN, J. H.; CRAWFORD, S. A.; MCELMEEL, M. L. e FIEBELKORN, K. R. Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. *J Clin Microbiol*, v.42, n.4, Apr, p.1800-1802. 2004.

KARCHMER, T. B.; DURBIN, L. J.; SIMONTON, B. M. e FARR, B. M. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, v.51, n.2, Jun, p.126-132. 2002.

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

KHOURY, J.; JONES, M.; GRIM, A.; DUNNE, W. M., JR. e FRASER, V. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a neonatal intensive care unit by active surveillance and aggressive infection control measures. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.26, n.7, Jul, p.616-621. 2005.

KIM, Y. H.; CHANG, S. S.; KIM, Y. S.; KIM, E. A.; YUN, S. C.; KIM, K. S. e PI, S. Y. Clinical outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-colonized neonates in the neonatal intensive care unit. *Neonatology*, v.91, n.4, p.241-247. 2007.

KIRBY, W. M. M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, v.99, p.452-453. 1944.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; FRIDKIN, S. K.; REINGOLD, A.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; DUMYATI, G.; TOWNES, J. M.; CRAIG, A. S.; FOSHEIM, G.; MCDOUGAL, L. K. e TENOVER, F. C. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis*, v.12, n.12, Dec, p.1991-1993. 2006.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; DUMYATI, G.; TOWNES, J. M.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; MCDOUGAL, L. K.; CAREY, R. B. e FRIDKIN, S. K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*, v.298, n.15, Oct 17, p.1763-1771. 2007.

KLOSS, W. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: K. B. Crossley e G. L. Archer (Ed.). *The Staphylococci in human disease*. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans, p.113-215.

KLUYTMANS-VANDENBERGH, M. F. e KLUYTMANS, J. A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin Microbiol Infect*, v.12 Suppl 1, Mar, p.9-15. 2006.

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

KOPP, B. J.; NIX, D. E. e ARMSTRONG, E. P. Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Ann Pharmacother*, v.38, n.9, Sep, p.1377-1382. 2004.

KOREEN, L.; RAMASWAMY, S. V.; GRAVISS, E. A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M. e KREISWIRTH, B. N. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol*, v.42, n.2, Feb, p.792-799. 2004.

LAMARO-CARDOSO, J.; CASTANHEIRA, M.; DE OLIVEIRA, R. M.; E SILVA, S. A.; PIGNATARI, A. C.; MENDES, R. E.; PIMENTA, F. C. e ANDRADE, A. L. Carriage of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.57, n.4, Apr, p.467-470. 2007.

LAMARO-CARDOSO, J.; DE LENCASTRE, H.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, R. M.; NOUER, S. S.; AIRES-DE-SOUSA, M.; MILHEIRICO, C. e ANDRADE, A. L. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *J Clin Microbiol*, v.47, n.12, Dec, p.3991-3997. 2009.

LARSON, E. L.; COHEN, B.; ROSS, B. e BEHTA, M. Isolation Precautions for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Electronic Surveillance to Monitor Adherence. *Am J Crit Care*, v.19, n.1, Jan, p.16-26; quiz 27. 2010.

LAURENT, F.; LELIEVRE, H.; CORNU, M.; VANDENESCH, F.; CARRET, G.; ETIENNE, J. e FLANDROIS, J. P. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antimicrob Chemother*, v.47, n.3, Mar, p.277-283. 2001.

LAWN, J. E.; COSTELLO, A.; MWANSAMBO, C. e OSRIN, D. Countdown to 2015: will the Millennium Development Goal for child survival be met? *Arch Dis Child*, v.92, n.6, Jun, p.551-556. 2007.

LAWN, J. E.; RUDAN, I. e RUBENS, C. Four million newborn deaths: is the global research agenda evidence-based? *Early Hum Dev*, v.84, n.12, Dec, p.809-814. 2008.

LE LOIR, Y.; BARON, F. e GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, v.2, n.1, p.63-76. 2003.

LEBON, A.; LABOUT, J. A.; VERBRUGH, H. A.; JADDOE, V. W.; HOFMAN, A.; VAN WAMEL, W.; MOLL, H. A. e VAN BELKUM, A. Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in infancy: the Generation R Study. *J Clin Microbiol*, v.46, n.10, Oct, p.3517-3521. 2008.

LEE, G. M.; HUANG, S. S.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; HINRICHSEN, V. L.; PELTON, S. I.; KLEINMAN, K.; HANAGE, W. P.; LIPSITCH, M.; MCADAM, A. J. e FINKELSTEIN, J. A. Epidemiology and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in children in the post-PCV7 era. *BMC Infect Dis*, v.9, p.110. 2009.

LEE, S.; PARK, Y. J.; EUN-JEE, O. H.; KAHNG, J.; YOO, J. H.; JEONG, I. H.; KWON, Y. N. e HAN, K. Comparison of protocols for surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): medical staff vs ICU patients. *Ann Clin Lab Sci*, v.37, n.3, p.248-250. 2007.

LIM, D. e STRYNADKA, N. C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol*, v.9, n.11, Nov, p.870-876. 2002.

LO, W. T.; LIN, W. J.; TSENG, M. H.; LU, J. J.; LEE, S. Y.; CHU, M. L. e WANG, C. C. Nasal carriage of a single clone of community-acquired methicillin-resistant

Staphylococcus aureus among kindergarten attendees in northern Taiwan. *BMC Infect Dis*, v.7, p.51. 2007.

LO, W. T.; LIN, W. J.; TSENG, M. H.; WANG, S. R.; CHU, M. L. e WANG, C. C. Risk factors and molecular analysis of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children. *Pediatr Infect Dis J*, v.27, n.8, Aug, p.713-718. 2008.

LOUREIRO, M. M.; DE MORAES, B. A.; QUADRA, M. R.; PINHEIRO, G. S.; SUFFYS, P. N. e ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.95, n.6, Nov-Dec, p.777-782. 2000.

LOVEDAY, H. P.; PELLOWE, C. M.; JONES, S. R. e PRATT, R. J. A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (Subgroup A). *J Hosp Infect*, v.63 Suppl 1, May, p.S45-70. 2006.

LU, P. L.; CHIN, L. C.; PENG, C. F.; CHIANG, Y. H.; CHEN, T. P.; MA, L. e SIU, L. K. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *J Clin Microbiol*, v.43, n.1, Jan, p.132-139. 2005.

LUCET, J. C.; PAOLETTI, X.; LOLOM, I.; PAUGAM-BURTZ, C.; TROUILLET, J. L.; TIMSIT, J. F.; DEBLANGY, C.; ANDREMONT, A. e REGNIER, B. Successful long-term program for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units. *Intensive Care Med*, v.31, n.8, Aug, p.1051-1057. 2005.

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

MATHERS, C. D. e LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, v.3, n.11, Nov, p.e442. 2006.

MATOUSKOVA, I. e JANOUT, V. Current knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v.152, n.2, Dec, p.191-202. 2008.

MAY, E. R.; HNILICA, K. A.; FRANK, L. A.; JONES, R. D. e BEMIS, D. A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *J Am Vet Med Assoc*, v.227, n.6, Sep 15, p.928-931. 2005.

MCDONALD, L. C.; LAUDERDALE, T. L.; LO, H. J.; TSAI, J. J. e HUNG, C. C. Colonization of HIV-infected outpatients in Taiwan with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Int J STD AIDS*, v.14, n.7, Jul, p.473-477. 2003.

MCDUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K. e TENOVER, F. C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol*, v.41, n.11, Nov, p.5113-5120. 2003.

MCGINIGLE, K. L.; GOURLAY, M. L. e BUCHANAN, I. B. The use of active surveillance cultures in adult intensive care units to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-related morbidity, mortality, and costs: a systematic review. *Clin Infect Dis*, v.46, n.11, Jun 1, p.1717-1725. 2008.

MELISH, M. E. e CAMPBELL, K. A. Coagulase-positive Staphylococcal infections. In: R. D. Feigin e J. D. Cherry (Ed.). *Textbook of pediatric infectious diseases*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. Coagulase-positive Staphylococcal infections, p.1039-1066.

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

MILHEIRICO, C.; OLIVEIRA, D. C. e DE LENCASTRE, H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.51, n.9, Sep, p.3374-3377. 2007.

MILLAR, B. C.; LOUGHREY, A.; ELBORN, J. S. e MOORE, J. E. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect*, v.67, n.2, Oct, p.109-113. 2007.

MORAN, G. J.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R. J.; FOSHEIM, G. E.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B. e TALAN, D. A. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*, v.355, n.7, Aug 17, p.666-674. 2006.

MORENO, C. A.; ROSENTHAL, V. D.; OLARTE, N.; GOMEZ, W. V.; SUSSMANN, O.; AGUDELO, J. G.; ROJAS, C.; OSORIO, L.; LINARES, C.; VALDERRAMA, A.; MERCADO, P. G.; BERNATE, P. H.; VERGARA, G. R.; PERTUZ, A. M.; MOJICA, B. E.; NAVARRETE MDEL, P.; ROMERO, A. S. e HENRIQUEZ, D. Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.27, n.4, Apr, p.349-356. 2006.

MULHOLLAND, E.; SMITH, L.; CARNEIRO, I.; BECHER, H. e LEHMANN, D. Equity and child-survival strategies. *Bull World Health Organ*, v.86, n.5, May, p.399-407. 2008.

MUTO, C. A.; JERNIGAN, J. A.; OSTROWSKY, B. E.; RICHTER, H. M.; JARVIS, W. R.; BOYCE, J. M. e FARR, B. M. SHEA guideline for preventing nosocomial

transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.24, n.5, May, p.362-386. 2003.

NAIMI, T. S.; LEDELL, K. H.; COMO-SABETTI, K.; BORCHARDT, S. M.; BOXRUD, D. J.; ETIENNE, J.; JOHNSON, S. K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R. N. e LYNFIELD, R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*, v.290, n.22, Dec 10, p.2976-2984. 2003.

NAKAMURA, M. M.; ROHLING, K. L.; SHASHATY, M.; LU, H.; TANG, Y. W. e EDWARDS, K. M. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population. *Pediatr Infect Dis J*, v.21, n.10, Oct, p.917-922. 2002.

NIMMO, G. R.; COOMBS, G. W.; PEARSON, J. C.; O'BRIEN, F. G.; CHRISTIANSEN, K. J.; TURNIDGE, J. D.; GOSBELL, I. B.; COLLIGNON, P. e MCLAWS, M. L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med J Aust*, v.184, n.8, Apr 17, p.384-388. 2006.

NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*, v.32, n.8, Dec, p.470-485. 2004.

NOUWEN, J. L.; FIEREN, M. W.; SNIJDERS, S.; VERBRUGH, H. A. e VAN BELKUM, A. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney Int*, v.67, n.3, Mar, p.1084-1092. 2005.

NULENS, E.; BROEX, E.; AMENT, A.; DEURENBERG, R. H.; SMEETS, E.; SCHERES, J.; VAN TIEL, F. H.; GORDTS, B. e STOBBERINGH, E. E. Cost of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch university hospital. *J Hosp Infect*, v.68, n.4, Apr, p.301-307. 2008.

O'BRIEN, F. G.; LIM, T. T.; CHONG, F. N.; COOMBS, G. W.; ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; MONK, A.; SAID-SALIM, B.; KREISWIRTH, B. N. e GRUBB, W. B. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol*, v.42, n.7, Jul, p.3185-3190. 2004.

O'BRIEN, F. G.; PEARMAN, J. W.; GRACEY, M.; RILEY, T. V. e GRUBB, W. B. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J Clin Microbiol*, v.37, n.9, Sep, p.2858-2862. 1999.

O'SULLIVAN, M. V.; CAI, Y.; KONG, F.; ZENG, X. e GILBERT, G. L. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, v.44, n.11, Nov, p.4072-4076. 2006.

OKUMA, K.; IWAKAWA, K.; TURNIDGE, J. D.; GRUBB, W. B.; BELL, J. M.; O'BRIEN, F. G.; COOMBS, G. W.; PEARMAN, J. W.; TENOVER, F. C.; KAPI, M.; TIENSASITORN, C.; ITO, T. e HIRAMATSU, K. Dissemination of new methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*, v.40, n.11, Nov, p.4289-4294. 2002.

OLIVEIRA, D. C. e DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.46, n.7, Jul, p.2155-2161. 2002.

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRICO, C. e DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother*, v.50, n.10, Oct, p.3457-3459. 2006.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A. e DE LENCASTRE, H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microb Drug Resist*, v.7, n.4, Winter, p.349-361. 2001.

OTTER, J. A. e FRENCH, G. L. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*, v.6, n.12, Dec, p.753-755. 2006.

OZAKI, K.; TAKANO, M.; HIGUCHI, W.; TAKANO, T.; YABE, S.; NITAHARA, Y.; NISHIYAMA, A. e YAMAMOTO, T. Genotypes, intrafamilial transmission, and virulence potential of nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children in the community. *J Infect Chemother*, v.15, n.2, Apr, p.84-91. 2009.

PARK, C.; LEE, D. G.; KIM, S. W.; CHOI, S. M.; PARK, S. H.; CHUN, H. S.; CHOI, J. H.; YOO, J. H.; SHIN, W. S.; KANG, J. H.; KIM, J. H.; LEE, S. Y.; KIM, S. M. e PYUN, B. Y. Predominance of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying staphylococcal chromosome cassette mec type IVA in South Korea. *J Clin Microbiol*, v.45, n.12, Dec, p.4021-4026. 2007.

PETERSEN, A. D.; WALKER, R. D.; BOWMAN, M. M.; SCHOTT, H. C. e ROSSER JR, E. J. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *Am Anim Hosp Assoc*, v.5, n.38, p.407-413. 2002.

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

PFALLER, M. A. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis*, v.7, n.2, Mar-Apr, p.312-318. 2001.

RAJARATNAM, J. K.; MARCUS, J. R.; FLAXMAN, A. D.; WANG, H.; LEVIN-RECTOR, A.; DWYER, L.; COSTA, M.; LOPEZ, A. D. e MURRAY, C. J. Neonatal, postneonatal, childhood, and under-5 mortality for 187 countries, 1970—2010: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 4. *Lancet*, v.6736, n.10, p.60703-60709. 2010.

REGEV-YOCHAY, G.; RUBINSTEIN, E.; BARZILAI, A.; CARMELI, Y.; KUINT, J.; ETIENNE, J.; BLECH, M.; SMOLLEN, G.; MAAVAN-METZGER, A.; LEAVITT, A.; RAHAV, G. e KELLER, N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerg Infect Dis*, v.11, n.3, Mar, p.453-456. 2005.

RESCH, A.; WILKE, M. e FINK, C. The cost of resistance: incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals. *Eur J Health Econ*, v.10, n.3, Jul, p.287-297. 2009.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A. Z.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P. F.; DA COSTA FERREIRA LEITE, C.; TEIXEIRA, L. A. e FIGUEIREDO, A. M. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.59, n.3, Nov, p.339-345. 2007.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M. C.; BERQUO, L.; FERREIRA, F. A.; SANTOS, R. N.; FERREIRA-CARVALHO, B. T. e FIGUEIREDO, A. M. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol*, v.43, n.4, Apr, p.1985-1988. 2005.

RIJAL, K. R.; PAHARI, N.; SHRESTHA, B. K.; NEPAL, A. K.; PAUDEL, B.; MAHATO, P. e SKALKO-BASNET, N. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in school children of Pokhara. *Nepal Med Coll J*, v.10, n.3, Sep, p.192-195. 2008.

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

ROZENBAUM, R.; SILVA-CARVALHO, M. C.; SOUZA, R. R.; MELO, M. C.; GOBBI, C. N.; COELHO, L. R.; FERREIRA, R. L.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; SCHUENCK, A. L.; NEVES, F. M.; SILVA, L. R. e FIGUEIREDO, A. M. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disseminated in a home care system. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.27, n.10, Oct, p.1041-1050. 2006.

SA-LEAO, R.; SANTOS SANCHES, I.; DIAS, D.; PERES, I.; BARROS, R. M. e DE LENCASTRE, H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol*, v.37, n.6, Jun, p.1913-1920. 1999.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A. e JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian

hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*, v.5, n.4, Aug, p.200-214. 2001.

SADER, H. S.; JONES, R. N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S. e BIEDENBACH, D. J. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.44, n.3, Nov, p.273-280. 2002.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; HOLLIS, R. J. e JONES, R. N. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.15, n.5, May, p.320-323. 1994.

SADOYAMA, G. e GONTIJO FILHO, P. P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a Brazilian university hospital. *Braz J Infect Dis*, v.4, n.3, Jun, p.135-143. 2000.

SAIMAN, L.; CRONQUIST, A.; WU, F.; ZHOU, J.; RUBENSTEIN, D.; EISNER, W.; KREISWIRTH, B. N. e DELLA-LATTA, P. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.24, n.5, May, p.317-321. 2003.

SAKAKI, H.; NISHIOKA, M.; KANDA, K. e TAKAHASHI, Y. An investigation of the risk factors for infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*, v.37, n.7, Sep, p.580-586. 2009.

SALGADO, C. D.; FARR, B. M. e CALFEE, D. P. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis*, v.36, n.2, Jan 15, p.131-139. 2003.

SANTOS, K. R.; TEIXEIRA, L. M.; LEAL, G. S.; FONSECA, L. S. e GONTIJO FILHO, P. P. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *J Med Microbiol*, v.48, n.1, Jan, p.17-23. 1999.

SCHRECKENBERGER, P. C.; ILENDO, E. e RISTOW, K. L. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*, v.42, n.6, Jun, p.2777-2779. 2004.

SCHUENCK, R. P.; NOUER, S. A.; WINTER CDE, O.; CAVALCANTE, F. S.; SCOTTI, T. D.; FERREIRA, A. L.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M. e DOS SANTOS, K. R. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.64, n.4, Aug, p.434-441. 2009.

SCRIBEL, L. V.; SILVA-CARVALHO, M. C.; SOUZA, R. R.; SUPERTI, S. V.; KVIKTO, C. H.; FIGUEIREDO, A. M. e ZAVASCKI, A. P. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a

university hospital in Porto Alegre, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.65, n.4, Dec, p.457-461. 2009.

SDOUGKOS, G.; CHINI, V.; PAPANASTASIOU, D. A.; CHRISTODOULOU, G.; STAMATAKIS, E.; VRIS, A.; CHRISTODOULIDI, I.; PROTOPAPADAKIS, G. e SPILIOPOULOU, I. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect*, v.14, n.11, Nov, p.995-1001. 2008.

SEATH, P. H. A. e SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: Freeman. 1973. 573 p.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B.; MARTINEZ, J.; HA, E.; CAMPO, M. L.; FIERMAN, A.; KRASINSKI, K.; KORNBLUM, J.; ALCABES, P.; WADDINGTON, M.; RIEHMAN, M. e KREISWIRTH, B. N. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *J Infect Dis*, v.182, n.1, Jul, p.359-362. 2000.

SHORR, A. F. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis*, v.45 Suppl 3, Sep 15, p.S171-176. 2007.

SIEGEL, J. D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. e COMMITTEE, T. H. I. C. P. A. *Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, 2006*. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA, p.74. 2006.

SIEGEL, J. D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. e THE HEALTHCARE INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE. *2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA, p.225. 2007.

SKINNER, D. e KEEFER, C. S. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *J Arch Intern Med*, v.68, n.5, November 1, p.851-875. 1941.

SOLA, C.; CORTES, P.; SAKA, H. A.; VINDEL, A. e BOCCO, J. L. Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina. *J Clin Microbiol*, v.44, n.1, Jan, p.192-200. 2006.

SONG, J.-H. *Global emergence of community-associated MRSA: an update*. 7th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance. Bangkok, Thailand: ISSAR. March 18-20, 2009. 102-104 p.

SOUSA-JUNIOR, F. C.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FERNANDES, M. J.; VIEIRA, M. F.; PELLEGRINO, F. L.; FIGUEIREDO, A. M.; DE MELO, M. C. e MILAN, E. P. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.10, Oct, p.877-881. 2009.

STRATIDIS, J.; BIA, F. J. e EDBERG, S. C. Use of real-time polymerase chain reaction for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.58, n.2, Jun, p.199-202. 2007.

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

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D. e GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.18, n.6, Jun, p.426-439. 1997.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H. e SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, v.33, n.9, Sep, p.2233-2239. 1995.

TRISTAN, A.; BES, M.; MEUGNIER, H.; LINA, G.; BOZDOGAN, B.; COURVALIN, P.; REVERDY, M. E.; ENRIGHT, M. C.; VANDENESCH, F. e ETIENNE, J. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis*, v.13, n.4, Apr, p.594-600. 2007.

UDO, E. E.; PEARMAN, J. W. e GRUBB, W. B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect*, v.25, n.2, Oct, p.97-108. 1993.

UNITED NATIONS. Millenium Development Goals: United Nations. Acesso em. Disponível em: <http://www.mdgmonitor.org/browse_goal.cfm>. 2000.

VAN BELKUM, A.; VERKAIK, N. J.; DE VOGEL, C. P.; BOELENS, H. A.; VERVEER, J.; NOUWEN, J. L.; VERBRUGH, H. A. e WERTHEIM, H. F. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis*, v.199, n.12, Jun 15, p.1820-1826. 2009.

VAN RIJEN, M. M. e KLUYTMANS, J. A. Costs and benefits of the MRSA Search and Destroy policy in a Dutch hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.28, n.10, Oct, p.1245-1252. 2009.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E.; HERMANS, P. W. e VAN EMBDEN, J. D. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. *Methods Enzymol*, v.235, p.196-205. 1994.

VANDENBERGH, M. F.; YZERMAN, E. P.; VAN BELKUM, A.; BOELENS, H. A.; SIJMONS, M. e VERBRUGH, H. A. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol*, v.37, n.10, Oct, p.3133-3140. 1999.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M. C.; LINA, G.; NIMMO, G. R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M. E. e ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*, v.9, n.8, Aug, p.978-984. 2003.

VIDAL, P. M.; TRINDADE, P. A.; GARCIA, T. O.; PACHECO, R. L.; COSTA, S. F.; REINERT, C.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E. M.; GARCIA, C. P. e LEVIN, A. S. Differences between "classical" risk factors for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the *staphylococcal cassette chromosome mec* type IV MRSA strain. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.30, n.2, Feb, p.139-145. 2009.

VIVONI, A. M.; DIEP, B. A.; DE GOUVEIA MAGALHAES, A. C.; SANTOS, K. R.; RILEY, L. W.; SENSABAUGH, G. F. e MOREIRA, B. M. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol*, v.44, n.5, May, p.1686-1691. 2006.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H. e PETERS, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med*, v.344, n.1, Jan 4, p.11-16. 2001.

WANNET, W. J.; HECK, M. E.; PLUISTER, G. N.; SPALBURG, E.; VAN SANTEN, M. G.; HUIJSDANS, X. W.; TIEMERSMA, E. e DE NEELING, A. J. Panton-Valentine leukocidin positive MRSA in 2003: the Dutch situation. *Euro Surveill*, v.9, n.11, Nov, p.28-29. 2004.

WANNET, W. J.; SPALBURG, E.; HECK, M. E.; PLUISTER, G. N.; TIEMERSMA, E.; WILLEMS, R. J.; HUIJSDENS, X. W.; DE NEELING, A. J. e ETIENNE, J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. *J Clin Microbiol*, v.43, n.7, Jul, p.3341-3345. 2005.

WEGENER, H. C.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A. e YANCEY, R. J., JR. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. *J Clin Microbiol*, v.32, n.3, Mar, p.793-795. 1994.

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

WERTHEIM, H. F. e VOS, M. C. Can mupirocin prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? *Crit Care*, v.9, n.3, Jun, p.257-258. 2005.

WERTHEIM, H. F.; VOS, M. C.; BOELEN, H. A.; VOSS, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; MEESTER, M. H.; KLUYTMANS, J. A.; VAN KEULEN, P. H. e VERBRUGH, H. A. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *J Hosp Infect*, v.56, n.4, Apr, p.321-325. 2004.

WHITBY, M.; MCLAWS, M. L. e BERRY, G. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med J Aust*, v.175, n.5, Sep 3, p.264-267. 2001.

WHO. *Global strategy for containment of antimicrobial resistance*. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Geneva, Switzerland, p.99. 2001.

_____. *WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care*. World Health Organization. Geneva, Switzerland, p.262. 2009.

ANEXO 1

MRSA carriage in neonatal intensive care units: a global systematic review

Maria Aparecida da Silva Vieira¹, Ruth Minamisava², Sabrina Sgambatti Andrade³, Luãine Roberta Nascimento Santos³, Ana Lucia S. S. Andrade^{3*}

¹ Teaching Hospital, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

² Faculty of Nursing, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

³ Department of Community Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

* Corresponding author. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235, esquina 1ª. Avenida, Setor Leste Universitário, Goiânia, Goiás. Zip code: 74605-050. Phone: +55 62 32027942 Fax: 55 62 32029051. E-mail: ana@iptsp.ufg.br

Abstract

Nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strongly predicts MRSA infection. This systematic review assessed the prevalence of MRSA nasal carriage in neonatal intensive care units (NICUs). We searched for relevant articles from Medline, Lilacs, IBECs, BDENF, MedCarib, SciELO, REPIDISCA, from 1975 to 2009. A total of 27 original articles were included in this review. We found a great diversity on prevalence of MRSA nasal carriage in NICUs worldwide, ranging from zero to 90.9%. Overall, low prevalences of MRSA nasal carriage were found in North America, whereas higher prevalences were obtained in the Asia continent. Recent changes in the epidemiological and molecular characteristics of MRSA nasal carriage could be identified with CA-MRSA infiltration into the NICUs environment.

Key words: methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA, newborns, nasal carriage, neonatal intensive care units

Introduction

Neonates in intensive care settings are particularly at risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections.^{1, 2} Despite the current amount of knowledge, MRSA, which is often multidrug-resistant, has become endemic in healthcare settings and cause frequent outbreaks in neonatal intensive care units (NICUs).³⁻⁵ The main source of *S. aureus* in hospitals comes from colonized patients. The anterior nares have been reported to be the most consistent site and potential determinant of colonization for *S. aureus* carriage.^{6, 7} MRSA nasal colonization has been strongly associated to subsequent infection.⁸

Studies on MRSA carriage may improve the understanding of the pathogenesis, the routes of transmission, the nosocomial epidemiology, as well the strategies for preventive measures against this major resistant microorganism. However, epidemiological data on MRSA nasal carriage in NICUs are scarce and need to be more deeply explored. Global information on the prevalence of MRSA nasal carriage in NICUs is essential for evidence-based assessment on the best controlling and preventing strategies. This systematic review was performed to estimate the extent of MRSA nasal carriage in NICUs; we also gathered information on the molecular epidemiology of the MRSA strains colonizing the neonates among the studies of prevalence of MRSA carriage.

Methods

Search strategy

We searched articles using the following online databases: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline), Spanish Bibliographic Index of the Health Sciences (IBECS), Scientific Electronic Library (SciELO), Caribbean Health Sciences Literature (MedCarib), Nursing Database (BDENF), and the Latin American and Caribbean Health Sciences Database (Lilacs). The databases were searched for published literature available until December 2009. The search algorithm was defined to improve the publication capture using free text terms as showed in Table I. A high sensitivity of search strategy was applied to all databases but Medline to allow capturing as much as possible the MRSA nasal carriage in NICUs. There were no controlled trials available on the subject.

Selection

The articles were selected from titles and abstracts by two independent reviewers in a parallel fashion, following the inclusion and exclusion criteria listed in Table II. Full-text articles were considered for analysis based on the agreement of the two independent reviewers. Differences in opinions of reviewers regarding article inclusion were solved through a senior investigator. Figure 1 displays the steps to select the articles included in this review

Analysis

We calculated the prevalence of MRSA carriage for each study. Prevalence rates and respective 95% confidence intervals were calculated considering the number of MRSA carriage (numerator), divided by the total number of newborns with swabs collected (denominator). Percentiles of prevalence rates were calculated to indicate the dissimilarity of the values. Information on year of publication, study design, study area, molecular tests (if any), potential sources of MRSA, and interventions to control and prevent MRSA were included.

Results

The literature search identified 361 articles (Figure 1). After screening titles and abstracts of the articles, 123 full-texts were retrieved and 27 of them met the inclusion criteria.^{3-5, 8-31} Among the 361 articles initially screened, 334 were excluded due to the following reasons: duplicated publication among databases (n=22), clearly unrelated articles (applying of inclusion criteria) (n=216), not nasal/nasopharyngeal specimens (n=62), non neonatal population (n=14), non neonatal intensive care setting (n=3), lack of denominator to ascertain the prevalence rate (n=17). Most of the 27 evaluated articles were published after 1999 (77.8%), and 15 out of them (55.6%) were performed in response to MRSA outbreaks. The studies were conducted in 12 countries especially in United States (40.7%) and Japan (18.5%). Table III shows that the prevalence of MRSA nasal carriage in NICUs ranged from zero to 90.9%.

Low rates of MRSA nasal carriage were observed in USA in contrast to higher prevalence in other regions (Figure 2). The highest rates in the USA were mostly related to

outbreak. It is noteworthy, however, that the majority of studies conducted in other regions of the world were reported as non-outbreak. Only articles from Asia and Latin America reached prevalence higher than the 50th percentile for non-outbreak nasal MRSA^{11, 13, 16, 19, 25, 26, 29, 31} led by Japan and Taiwan.^{16, 19}

Table IV shows the interventions applied for MRSA control and prevention for infection and colonization. Not all studies described the control measures applied, making difficult to identify such interventions for every study. The majority of the studies (24/27) reported at least one intervention. Apart from the newborn screening, the most common attempts to control and prevent MRSA were hand hygiene, isolation of the newborns, decolonization, personnel education, contact precautions, and screening of nasal specimen in healthcare staff. Only three investigations from North America reported active routine surveillance for MRSA carriage.

Discussion

This publication assessed the prevalence of MRSA nasal carriage in NICUs by systematic review. There are great variations in MRSA prevalence across Regions of the world. Overall, our results point out low rates of MRSA nasal carriage in NICUs in USA in contrast to high prevalence in other countries. This observation is not so strong for Europe, Middle East, and Latin America, since we found few studies in such regions. However, the absence of studies in the available literature does not mean low prevalence of MRSA carriage or nonexistence of outbreaks.

In USA, we found lower prevalence of MRSA carriage compared with Asia,^{8, 13, 14, 26} where MRSA infection appears to be endemic^{16, 32}. One of the main reasons for the low prevalence in the USA seems to be the active surveillance system, which adopts intensified control measures when the incidence of MRSA infection in NICU is not decreasing, or when the first case/outbreak is identified. The control efforts include the monitoring of colonization rate,^{2, 33} which help the identification of the source of infection within the NICUs. In fact, most of studies from USA performed laboratory active surveillance and identified the potential source of MRSA by molecular tools.^{4, 10, 22-24, 27} Of note is that no study on MRSA nasal carriage was reported in NICUs in the Nordic countries where the search-and-destroy policy has been implemented.³⁴⁻³⁶ Persistent high rates of MRSA colonization were observed in countries of Asia suggesting an endemic situation at an

unsustainable level. The perspective of the scenario in NICUs in Asian is certainly a matter of great concern. Of course, the primary aim of infection control is to control the spread of infection, however MRSA carriage is a useful indicator of cross-contamination and its spread. Also, high rates of MRSA carriage can suggest that part of healthcare workers are unaware of the attributable morbidity due to MRSA carriage and can also suggest weaknesses in prevention and control strategies of MRSA transmission.

In the last ten years, significant advances have been achieved in molecular biology, providing new possibilities to MRSA outbreak investigations. Therefore, most of the studies in NICUs that performed molecular tests identified the probable sources of infection/colonization. The increased efficiency and discriminatory power of the molecular tests in epidemiological investigation, surely contributed to control the spread of MRSA carriage clones in neonates.^{4, 5, 8, 10, 15, 19, 21-24, 30, 31} Given the small number of MRSA clones by region, surveillance of these clones may be feasible and encouraged.

Currently, the main concern about MRSA is the spread of both, community-associated (CA-MRSA) and healthcare-associated (HA-MRSA) infections worldwide. So far, HA-MRSA is known to be a serious threat especially to hospitalized patients, but the studies pointed out the current CA-MRSA infiltration into the NICUs environment. The dissemination of CA-MRSA may be signing a new perspective in the epidemiological changes in CA-MRSA in NICUs, enhancing the risk to newborns.^{37, 38} Another concern is the identification of CA-MRSA PVL-positive in NICUs, a presumed virulence factor for MRSA infection.^{5, 8, 22, 39}

Several strategies have been proposed for control and prevention of MRSA infection and colonization in NICUs. Usually, each hospital follows a protocol because there are different opinions on the optimal approach to control MRSA infection and carriage. The Centers for Disease Control and Prevention recommends intensifying control measures with one or more strategies, as personnel education, judicious antimicrobial use, active surveillance cultures, contact precautions, hand hygiene, environmental measures, and nasal decolonization.²

We found different actions adopted for controlling MRSA carriage in NICUs. Even though, all studies reported total or partial success in controlling MRSA transmission regardless of the endemic or epidemic level. The majority of the studies reported staff hand hygiene^{3-5, 8, 10-15, 17, 18, 20-26, 28-30} and isolation of newborn^{3-5, 8-10, 12, 14-18, 20-26, 28}. This finding suggests that researchers and healthcare workers recognize these measures as the most

important interventions in the control and prevention of MRSA transmission, although some investigators have mentioned low adherence of the staff team to hand hygiene. This observation opens an opportunity to reinforce the new guidelines on hand hygiene using alcohol hand-rub procedures⁴⁰⁻⁴³ that achieve better compliance than handwashing with soap and water only.⁴⁴ On the other hand, newborn isolation requires administrative resources and highly qualified staff which are scarce especially in less developed regions.⁴⁵ In summary, reinforcement of hand hygiene seems to be a key point for the success of controlling MRSA transmission in NICUs whereas other interventions should be based on the local assessment, taking into account the local epidemiology, prevalence and feasibilities.²

Some limitations of this review have to be considered. We did not contact investigators to access data not published. All articles included in this review were observational studies. In spite of several guidelines including checklist to report observational studies, few quality assessment tools for the systematic reviews of observational studies are available.^{46, 47} In this review two authors independently assessed the quality of each study, taking into account two parameters: accuracy of MRSA identification and availability of data to ascertain the prevalence of MRSA prevalence. Epidemiological and methodological differences in study design make international comparisons difficult. Also, it was not possible to estimate a pooled prevalence of MRSA nasal carriage because of the heterogeneity of the studies. The reasons for not estimating an overall prevalence of nasal MRSA were as: outbreak/non outbreak studies, characteristics of the NICUs, follow-up time of the outbreak, and study design.

In conclusion, this review provided an up-to-date of the epidemiology of MRSA nasal carriage in NICUs allowing us to take home some important messages. First, MRSA is spread in NICUs worldwide. Second, the prevalence of MRSA carriage is heterogeneous around the world. The third lesson is that CA-MRSA strains overrun NICUs, intensifying the risk to neonates, since neonatal carriage acts as a latent reservoir, and can be an important source of transmission in healthcare settings.

Conflict of interest statement - None.

This investigation was supported by the National Institute of Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS) – National Council for Scientific and

Technological Development (CNPq) /Brazil, Ministry of Science and Technology, Ministry of Health. ALA (grant # 309196/2007-8) is fellowship of CNPq.

References

1. Blatnik J, Lesnicar G. Propagation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* due to the overloading of medical nurses in intensive care units. *J Hosp Infect.* Jun 2006;63(2):162-166.
2. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Committee tHICPA. *Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, 2006.* Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention;2006.
3. Regev-Yochay G, Rubinstein E, Barzilai A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerg Infect Dis.* Mar 2005;11(3):453-456.
4. Sarda V, Molloy A, Kadkol S, Janda WM, Hershow R, McGuinn M. Active surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Sep 2009;30(9):854-860.
5. Sax H, Posfay-Barbe K, Harbarth S, et al. Control of a cluster of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatology. *J Hosp Infect.* May 2006;63(1):93-100.
6. Doebbeling BN. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in healthcare workers. *J Chemother.* Apr 1994;6 Suppl 2:11-17.
7. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* Dec 2005;5(12):751-762.
8. Seybold U, Halvosa JS, White N, Voris V, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of community origin in intensive care nurseries. *Pediatrics.* Nov 2008;122(5):1039-1046.
9. Al Reyami E, Al Zoabi K, Rahmani A, Tamim M, Chedid F. Is isolation of outborn infants required at admission to the neonatal intensive care unit? *Am J Infect Control.* May 2009;37(4):335-337.
10. Behari P, Englund J, Alcasid G, Garcia-Houchins S, Weber SG. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to preterm infants through breast milk. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Sep 2004;25(9):778-780.
11. de Almeida Silva H, Steffen Abdallah VO, Carneiro CL, Gontijo PP. Infection and colonization by *Staphylococcus aureus* in a high risk nursery of a Brazilian teaching hospital. *Braz J Infect Dis.* Dec 2003;7(6):381-386.
12. Dunkle LM, Naqvi SH, McCallum R, Lofgren JP. Eradication of epidemic methicillin-gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care nursery. *Am J Med.* Feb 1981;70(2):455-458.
13. Gill CJ, Mantaring JB, Macleod WB, et al. Impact of enhanced infection control at 2 neonatal intensive care units in the Philippines. *Clin Infect Dis.* Jan 1 2009;48(1):13-21.
14. Gregory ML, Eichenwald EC, Puopolo KM. Seven-year experience with a surveillance program to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics.* May 2009;123(5):e790-796.

15. Hitomi S, Kubota M, Mori N, et al. Control of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit by unselective use of nasal mupirocin ointment. *J Hosp Infect.* Oct 2000;46(2):123-129.
16. Huang YC, Chou YH, Su LH, Lien RI, Lin TY. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and its association with infection among infants hospitalized in neonatal intensive care units. *Pediatrics.* Aug 2006;118(2):469-474.
17. Jernigan JA, Titus MG, Groschel DH, Getchell-White S, Farr BM. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Epidemiol.* Mar 1 1996;143(5):496-504.
18. Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* Jun 2002;51(2):126-132.
19. Kikuchi K, Takahashi N, Piao C, Totsuka K, Nishida H, Uchiyama T. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards. *J Clin Microbiol.* Jul 2003;41(7):3001-3006.
20. Kim YH, Chang SS, Kim YS, et al. Clinical outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-colonized neonates in the neonatal intensive care unit. *Neonatology.* 2007;91(4):241-247.
21. Loureiro MM, de Moraes BA, Quadra MR, Pinheiro GS, Suffys PN, Asensi MD. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Nov-Dec 2000;95(6):777-782.
22. McAdams RM, Ellis MW, Trevino S, Rajnik M. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Int.* Dec 2008;50(6):810-815.
23. McDonald JR, Carriker CM, Pien BC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in an intensive care nursery: potential for interinstitutional spread. *Pediatr Infect Dis J.* Aug 2007;26(8):678-683.
24. Morel AS, Wu F, Della-Latta P, Cronquist A, Rubenstein D, Saiman L. Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a mother to her preterm quadruplet infants. *Am J Infect Control.* May 2002;30(3):170-173.
25. Oto-Larios MA, Pinto-Claude ME, Martinez-C. V, et al. [Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a neonatal ward]. *Rev Chil Pediatr.* 1992;63(3):134-138.
26. Sakaki H, Nishioka M, Kanda K, Takahashi Y. An investigation of the risk factors for infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.* Sep 2009;37(7):580-586.
27. Singh K, Gavin PJ, Vescio T, et al. Microbiologic surveillance using nasal cultures alone is sufficient for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in neonates. *J Clin Microbiol.* Jun 2003;41(6):2755-2757.
28. Tan KW, Tay L, Lim SH. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit in Singapore: a 20-month study of clinical characteristics and control. *Singapore Med J.* Jun 1994;35(3):277-282.
29. Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, et al. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns by viridans group streptococci. *Clin Infect Dis.* May 15 2001;32(10):1399-1407.

30. Villari P, Iacuzio L, Torre I, Scarcella A. Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. *J Infect.* Nov 1998;37(3):274-281.
31. Yasunaka K, Kono K. Epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Fukuoka University Hospital. *Microb Drug Resist.* Fall 1999;5(3):207-213.
32. Chuang YY, Huang YC, Lee CY, Lin TY, Lien R, Chou YH. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in neonatal intensive care units: an analysis of 90 episodes. *Acta Paediatr.* Jun 2004;93(6):786-790.
33. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings.* Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention;2007.
34. Raineri E, Crema L, De Silvestri A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in an intensive care unit: a 10 year analysis. *J Hosp Infect.* Dec 2007;67(4):308-315.
35. Vos MC, Behrendt MD, Melles DC, et al. 5 years of experience implementing a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy at the largest university medical center in the Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Oct 2009;30(10):977-984.
36. Wertheim HF, Vos MC, Boelens HA, et al. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *J Hosp Infect.* Apr 2004;56(4):321-325.
37. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* Sep 2 2006;368(9538):874-885.
38. Klevens RM, Morrison MA, Fridkin SK, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis.* Dec 2006;12(12):1991-1993.
39. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* Aug 1 2007;45(3):315-321.
40. WHO. *WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care.* Geneva, Switzerland: World Health Organization;2009.
41. Kampf G, Löffler H, Gastmeier P. Hand hygiene for the prevention of nosocomial infections. *Dtsch Arztebl Int.* Oct 2009;106(40):649-655.
42. Sroka S, Gastmeier P, Meyer E. Impact of alcohol hand-rub use on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an analysis of the literature. *J Hosp Infect.* Jan 8 2009.
43. Sax H, Allegranzi B, Uckay I, Larson E, Boyce J, Pittet D. 'My five moments for hand hygiene': a user-centred design approach to understand, train, monitor and report hand hygiene. *J Hosp Infect.* Sep 2007;67(1):9-21.
44. Allegranzi B, Sax H, Bengaly L, et al. Successful implementation of the world health organization hand hygiene improvement strategy in a referral hospital in Mali, Africa. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Feb 2010;31(2):133-141.

45. Nickerson EK, West TE, Day NP, Peacock SJ. *Staphylococcus aureus* disease and drug resistance in resource-limited countries in south and east Asia. *Lancet Infect Dis*. Feb 2009;9(2):130-135.
46. Sanderson S, Tatt ID, Higgins JP. Tools for assessing quality and susceptibility to bias in observational studies in epidemiology: a systematic review and annotated bibliography. *Int J Epidemiol*. Jun 2007;36(3):666-676.
47. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet*. Oct 20 2007;370(9596):1453-1457.

Table I. *Algorithm* for MRSA carriage search by database.

Database	Algorithm
Medline	((carrier OR outbreak OR carriage OR colonization OR colonized OR colonisation OR colonised) AND (meticillin-resistant OR <i>Staphylococcus aureus</i> OR MRSA OR methicillin-resistant OR methicilin-resistant) AND (Intensive Care unit OR neonatal Intensive Care Units OR Neonatal intensive care OR neonatal intensive care unit OR critical care OR intensive care OR critically ill OR intensive unit OR neonatal unit OR intensive therapy) AND (neonate OR neonatal OR newborn))
Lilacs	aureus [Words] and (neonatal OR newborn) [Words]
IBECS	aureus [Words] and (neonatal OR newborn) [Words]
SciELO	aureus [Words] and (neonatal OR newborn) [Words]
MedCarib	aureus [Words] and (neonatal OR newborn) [Words]
BDENF	aureus [Words] and (neonatal OR newborn) [Words]

Table II. Inclusion and exclusion criteria for selection of articles.

Inclusion criteria

1. In vivo studies, in humans, newborns
2. Original articles
3. Studies related to carrier of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
4. Studies collecting nasal or nasopharyngeal swabs
5. Studies conducted in Neonatal Intensive Care Units
6. Cross-sectional, cohort, surveillance or descriptive studies
7. English, Spanish and Portuguese articles

Exclusion criteria

1. Studies focusing only on methicillin-sensible *Staphylococcus aureus* (MSSA) carriage
 2. Lack of data on numerator (number of neonates MRSA carriage) or denominator (number of neonates with swabs collected)
-

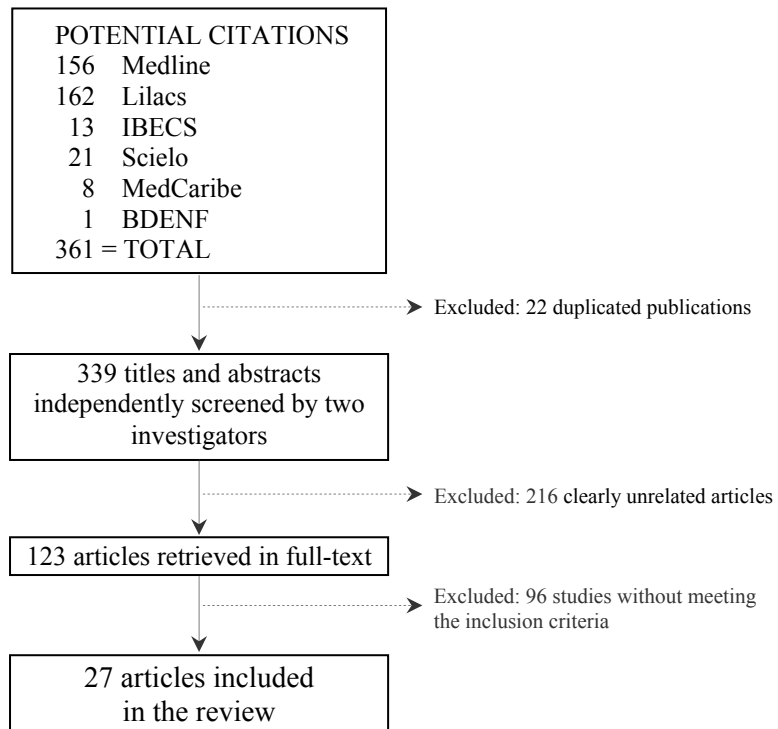


Figure 1. Flowchart for article selection.

Table III. Studies on MRSA* carriage in newborns admitted to Neonatal Intensive Care Units by Regions.

Regions and Countries	Authors, year	Study design	MRSA Outbreak	MRSA/newborns	Prevalence % (95%CI)	SCCmec [†]	Molecular tests	Potential source of MRSA
North America (n=11)								
United States	Dunkle <i>et al.</i> 1981	Cohort	yes	34/137	24.8 (17.8-32.9)	not done	not done	Not identified
	Jernigan <i>et al.</i> 1996	Cohort	yes	12/331	3.6 (1.9- 6.2)	not done	not done	Neonate with conjunctivitis and nurses
	Karchmer <i>et al.</i> 2002	Cohort	yes	18/597	3.0 (1.8- 4.7)	not done	not done	Not identified
	Morel <i>et al.</i> 2002	Cohort	yes	4/40	10.0 (2.8-23.7)	not done	PFGE [‡]	Mother-to-newborn transmission
	Singh <i>et al.</i> 2003	Cohort	yes	32/558	5.7 (3.9-8.0)	not done	PFGE	Neonate with endotracheal tube infected and with bloodstream infection
	Behari <i>et al.</i> 2004	Cohort	yes	33/498	6.6 (4.6-9.2)	not done	PFGE	Contaminated breast milk
	McDonald <i>et al.</i> 2007	Cohort	yes	14/460	3.0 (1.7-5.0)	not done	PFGE	Neonate with conjunctivitis
	McAdams <i>et al.</i> 2008	Cohort	yes	2/676	0.3 (0.03-1.1)	IVa; PVL [§] (+)	PFGE	Neonate transferred from other hospital
	Seybold <i>et al.</i> 2008	Cohort	no	12/996	1.2 (0.6-2.1)	II, IV; PVL(+), V	PFGE	Not identified
	Gregory <i>et al.</i> 2009	Cohort	no	87/7997	1.1 (0.9-1.3)	not done	not done	Neonate with bloodstream infection
	Sarda <i>et al.</i> 2009	Cohort	yes	21/435	4.8 (3.0-7.3)	not done	Real-time PCR**	Neonate transferred from other hospital
Europe (n=2)								
Italy	Villari <i>et al.</i> 1998	Cohort	yes	48/343	14.0 (10.5-18.1)	not done	PFGE, Southern blot	Neonate colonized with MRSA
Switzerland	Sax <i>et al.</i> 2006	Cohort	yes	7/32	21.9 (9.3-40.0)	I, IV; PVL(+)	PFGE, MLST ^{††}	A nurse who was mother of the index case
Asia (n=9)								
Singapore	Tan <i>et al.</i> 1994	Cohort	yes	13/137	9.5 (5.1-15.7)	not done	not done	Not identified
Japan	Yasunaka <i>et al.</i> 1999	Prevalence	no	5/25	20.0 (6.8-40.7)	not done	PFGE	Adult hospitalized at the same hospital
	Hitomi <i>et al.</i> 2000	Cohort	yes	30/33	90.9 (75.7-98.1)	not done	PFGE	Medical staff
	Uehara <i>et al.</i> 2001	Cohort	no	88/415	21.2 (17.4-25.5)	not done	not done	Not identified
	Kikuchi <i>et al.</i> 2003	Cohort	no	30/61	49.2 (36.1-62.3)	II	PFGE	Not identified
	Sakaki <i>et al.</i> 2009	Cohort	no	180/923	19.5 (17.0-22.2)	not done	not done	Not identified
Taiwan	Huang <i>et al.</i> 2006	Cohort	no	323/783	41.2 (37.8-44.8)	not done	PFGE, MLST	Neonate transferred from other hospital and/or Mother-to-newborn transmission
Korea	Kim <i>et al.</i> 2007	Cohort	no	152/1456	10.4 (8.9-12.1)	not done	not done	Not identified
Philippines	Gill <i>et al.</i> 2009	Before-After	no	416/2903	14.3 (13.1-15.6)	not done	not done	Not identified
Middle East (n=2)								
Israel	Regev-Yochay <i>et al.</i> 2005	Prevalence	yes	7/30	23.3 (9.9-42.3)	IV; PVL(-)	PFGE	Parent of the index patient or a MRSA carrier nurse
Saudi Arabia	Al Reyami <i>et al.</i> 2009	Prevalence	no	0/239	0.0 -	not done	not done	Not identified
Latin America (n=3)								
Brazil	Loureiro <i>et al.</i> 2000	Cohort	yes	43/90	47.8 (37.1-58.6)	not done	PFGE	Neonate with bloodstream infection
	de Almeida Silva <i>et al.</i> 2003	Prevalence	no	30/143	20.1 (14.6-28.6)	not done	not done	Not identified
Chile	Oto-Larios <i>et al.</i> 1992	Prevalence	no	48/299	16.0 (12.1-20.7)	not done	not done	Not identified

* MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

§ PVL: Panton-Valentine leukocidin

† SCCmec: staphylococcal cassette chromosome

** Real-time PCR: Real-time polymerase chain reaction

‡ PFGE: pulsed field gel electrophoresis

†† MLST: multi-locus sequence typing

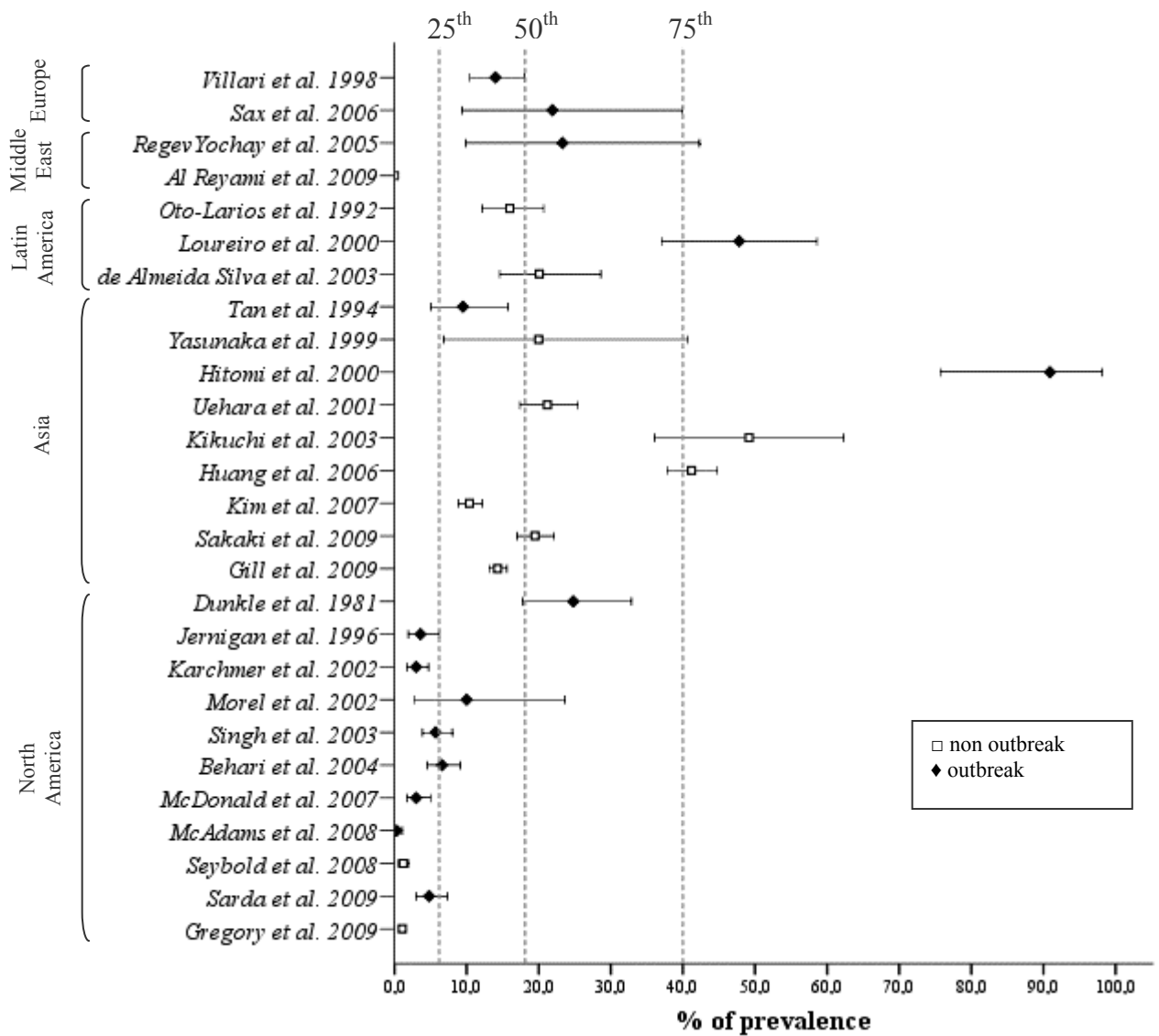


Figure 2. Prevalence of MRSA carriage with 95% of confidence interval of studies. The horizontal lines represent the 95% confidence interval for the point prevalence. The dashed vertical lines denote the 25th, 50th, and 75th percentiles of the prevalence dataset distribution.

Table IV. Strategies used to control and prevent MRSA carriage in Neonatal Intensive Care Units.

REGION, FIRST AUTHOR, YEAR	DESCRIPTION OF MRSA OUTBREAK	INTERVENTIONS TO CONTROL AND PREVENT MRSA												
		SCREENING OF SPECIMEN			SUBJECTS		NASAL MUPIROICIN		HAND HYGIENE		CHLOR-HEXIDINE	CONTACT PRECAUTIONS†	PERSONNEL EDUCATION	OTHER
		site	staff	environment	isolated newborn	nurse cohort	newborn	staff	soap+ water	alcohol based				
<u>NORTH AMERICA</u>														
Dunkle <i>et al.</i> 1981	yes	nasal, umbilicus	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Adequate nurse-newborn ratio; judicious use of antibiotic; decolonization
Jernigan <i>et al.</i> 1996	yes	nasal, axilla, groin	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	Mask
Karchmer <i>et al.</i> 2002	yes	nasal, axilla, groin, umbilicus	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Triple dye to umbilical; mask; adequate nurse-newborn ratio
Morel <i>et al.</i> 2002	yes	nasal	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	Hexachlorophene baths to neonate
Singh <i>et al.</i> 2003	yes	nasal, axilla, rectal, umbilicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Behari <i>et al.</i> 2004	yes	nasal, throat, umbilicus	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	
McDonald <i>et al.</i> 2007	yes	nasal, umbilicus	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	Notifying infection-control personnel
McAdams <i>et al.</i> 2008	yes	nasal, inguinal	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Equipment was cleaned/disinfected
Seybold <i>et al.</i> 2008	no	nasal, rectal	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
Gregory <i>et al.</i> 2009	no	nasal, rectal	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
Sarda <i>et al.</i> 2009	yes	nasal	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Judicious use of antibiotic; staff decolonization
<u>EUROPE</u>														
Villari <i>et al.</i> 1998	no	nasopharyngeal, throat	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Judicious use of antibiotic
Sax <i>et al.</i> 2006	yes	nasal, perineum, umbilicus	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	Revised decontamination practices
<u>MIDDLE EAST</u>														
Regev-Yochay <i>et al.</i> 2005	yes	nasal, umbilicus	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
Al Reyami <i>et al.</i> 2009	no	nasal, rectal, ear, axilla, groin	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
<u>ASIA</u>														
Tan <i>et al.</i> 1994	yes	nasal	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	Adequate nurse-newborn ratio; early discharge
Yasunaka <i>et al.</i> 1999	no	nasal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hitomi <i>et al.</i> 2000	yes	nasal, throat	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	Fresh towels; NICU cleaning
Uehara <i>et al.</i> 2001	no	nasal, oral	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	Methylrosanilinium chloride
Kikuchi <i>et al.</i> 2003	no	nasal, oral, rectal, umbilicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Huang <i>et al.</i> 2006	no	nasal	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
Kim <i>et al.</i> 2007	no	nasal	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	Triple dye; NICU cleaning;
Sakaki <i>et al.</i> 2009	no	nasal	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	
Gill <i>et al.</i> 2009	no	nasal, umbilicus	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
<u>LATIN AMERICA</u>														
Oto-Larios <i>et al.</i> 1992	yes	nasal	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	Protocol implementation; neomycin and bacitracin; mask; decolonization
Loureiro <i>et al.</i> 2000	yes	nasal	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	
de Almeida Silva <i>et al.</i> 2003	no	nasal, anus, mouth	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Judicious use of antibiotic



ANEXO 2



REDE VIGIA-CRIANÇA

PA

FORMULÁRIO 1

ELEGIBILIDADE

Centro Participante: HMI
Nome da criança:
Data de nascimento: / /200
Idade em anos:
Sexo: (1) masculino (2) feminino

CRIANÇA ELEGÍVEL

CRIANÇA MENOR DE 72 MESES DE IDADE (5 ANOS)

Criança elegível?	(1) sim	(2) não
Assinou TCLE?	(1) sim	(2) não
Assinou ADM?	(1) sim	(2) não

Data: / /200 _____

Nome do entrevistador: _____

Assinatura _____



REDE VIGIA-CRIANÇA

FORMULÁRIO 2

SOLICITAÇÃO DE CULTURA DE SWAB NASAL

Nome da Criança:			
Município: GOIÂNIA			
Centro Participante: HMI			
Idade (em meses):			
Sexo:	(1) Masculino	(2) Feminino	

Coletado na	narina direita	(1) sim	(2) não
	narina esquerda	(1) sim	(2) não

Data da coleta:	/	/200
Hora da coleta:		
Data da entrega no IPTSP:	/	/200
Hora da entrega no IPTSP:		

Acrescente comentários se a amostra não for coletada ou processada de acordo com o protocolo do estudo.

Nome do coletador: _____

Assinatura _____



FORMULÁRIO 3

DADOS COLETADOS COM MÃE / PAI

Nome da criança: _____

DADOS DA CRIANÇA

Endereço:					
Tel Resid:	Celular:	Outro:			
Má-formação:	(1) sim	(2) não			
Raça:	(1) branca	(2) negra	(3) parda	(4) asiática	(5) indígena
História de:	Infecção de pele	(1) não	(2) sim, nos últimos 6 m	(3) sim, nos últimos 12 m	
	Alergia de pele	(1) não	(2) sim, nos últimos 6 m	(3) sim, nos últimos 12 m	
	Otite	(1) não	(2) sim, nos últimos 6 m	(3) sim, nos últimos 12 m	
	Amigdalite	(1) não	(2) sim, nos últimos 6 m	(3) sim, nos últimos 12 m	
	Pneumonia	(1) não	(2) sim, nos últimos 6 m	(3) sim, nos últimos 12 m	
	Internação	(1) não internou	(2) sim, nos últimos 6 m	(3) sim, nos últimos 12 m	
	Uso de antibióticos	(1) não	(2) sim, nos últimos 7 dias	(3) sim, nos últimos 3 m	
		(4) não sabe	(5) sim, nos últimos 6 m	(6) sim, nos últimos 12 m	
	Se sim, quais?	_____			

FAMÍLIA

Nome da mãe:				
Escolaridade da mãe:	(1) não alfabetizada	(2) fundamental	(3) médio	(4) superior
Quantas pessoas existem na casa (incluindo a criança)?				
Renda familiar: R\$:				

Algum membro da família

É trabalhador da área de saúde?	(1) sim	(2) não	(3) não sabe	
Fuma?	(1) sim	(2) não	(3) não sabe	
Frequêntou creche nos últimos 6 meses?	(1) sim	(2) não	(3) não sabe	
Esteve internado nos últimos 6 meses?	(1) sim	(2) não	(3) não sabe	
Teve nos últimos 6 meses:				
	pneumonia	(1) sim	(2) não	(3) não sabe
	otite	(1) sim	(2) não	(3) não sabe
	conjuntivite	(1) sim	(2) não	(3) não sabe
	infecção de pele	(1) sim	(2) não	(3) não sabe

Nome do entrevistador: _____

Assinatura _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**Epidemiologia molecular de *S. aureus* de portador nasal em crianças
atendidas no Pronto Atendimento e UTIs de Goiânia**

REDE VIGIA-CRIANÇA

ANEXO 3



UCIN

FORMULÁRIO 1

ELEGIBILIDADE

Centro Participante:	(1) HMI	(2) HOSPITAL DA CRIANÇA	(3) HC-UFG	(4) STA BÁRBARA
Nome da criança:				
Nº prontuário:				
Data de nascimento:	/	/200	Hora do nascimento:	
Idade em dias:				
Sexo:	(1) masculino	(2) feminino		

Coletou swab nasal da admissão?	(1) sim	(2) não
---------------------------------	---------	---------

DADOS DA ADMISSÃO

Data de admissão na UTI:	/	/200
Hora da admissão na UTI:		
Peso ao nascer (em gramas):	(9) não sabe	
Apgar 1º minuto:	Apgar 5º minuto:	
Idade gestacional (em semanas completas):	(9) não sabe	
Má-formação:	(1) sim	(2) não

DIAGNÓSTICO(S) DA ADMISSÃO

Pneumonia	(1) sim	(2) não
Bacteremia	(1) sim	(2) não
Sepse de início precoce (< 7 dias)	(1) sim	(2) não
Sepse de início tardio (≥ 7 dias)	(1) sim	(2) não
Meningite	(1) sim	(2) não
Conjuntivite	(1) sim	(2) não
Dermatite de contato	(1) sim	(2) não
Infecção de pele	(1) sim	(2) não
Outra Doença Infecciosa	(1) sim	(2) não
Se sim, especifique:		
Patologia não infecciosa	(1) sim	(2) não
Se sim, especifique:		

DADOS FAMILIARES

Nome da mãe:			
Endereço da criança:			
Tel Resid:	Celular:	Outro:	
Escolaridade da mãe:	(1) não alfab	(2) fundamental	(3) médio (4) superior
Renda familiar: R\$:			

Dados da última gestação

Nº de consultas no pré-natal:			
Tipo de parto:	(1) cesáreo	(2) vaginal com episio	(3) vaginal sem episio
Gestação múltipla?	(1) sim	(2) não	

Data: ____ / ____ /2008. Nome do entrevistador: _____



FORMULÁRIO 2

EVOLUÇÃO E ALTA

Nome da criança:
Nº prontuário:

CPAP:	(1) sim	(2) não
--------------	---------	---------

Sonda nasogástrica:	(1) sim	(2) não
----------------------------	---------	---------

Hemocultura:

Data da primeira hemocultura:

Coletou <i>swab</i> nasal da alta / óbito?	(1) sim	(2) não
--	---------	---------

Histórico de Diagnósticos Médicos durante a Internação

Doenças infecciosas:	(1)
	(2)
	(3)
	(4)
Doenças não infecciosas:	(5)
	(6)
	(7)
	(8)
	(9)

Data: ____ / ____ /2008. **Nome do entrevistador:** _____

SES
SECRETARIA
DA SAÚDE

Hospital Materno Infantil



Um Estado melhor a cada dia

CARTA DE APROVAÇÃO

Goiânia, 06 de março de 2007.

Protocolo CEP-HMI Nº 006/07

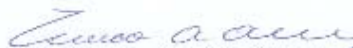
Título do Projeto: Epidemiologia Molecular de Staphylococcus Aureus de portador nasal e de Infecções invasivas em crianças atendidas no pronto atendimento de UTIS de Goiânia.

Sr.(a):Investigador(a) Responsável: Ana Lucia Sgambatti de Andrade.

Comunicamos-lhe que no dia 02 de março de 2007 na reunião mensal do **Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Materno Infantil CEP-HMI**, analisou e aprovou o Projeto de Pesquisa acima referido bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e estes considerados conforme com os princípios éticos vigentes

Lembramos, ainda, ao investigador responsável, a necessidade de encaminhar ao CEP-HMI relatórios trimestrais do andamento, encerramento, conclusão e publicação da pesquisa.

Atenciosamente,


Dr. Marco Aurélio Albernaz
Coordenador do CEP-HMI

Dr. Marco Aurélio Albernaz
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa - HMI