



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas



Importância do Ambiente (Ar e Superfície) e das Mãos
de Profissionais de Saúde na Epidemiologia de Pneumonia
Associada à Ventilação Mecânica por *Staphylococcus*
aureus em Unidade de Terapia Intensiva de Adultos

LÍLIAN ALVES ROCHA

Uberlândia

Junho - 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas



Importância do Ambiente (Ar e Superfície) e das Mãos
de Profissionais de Saúde na Epidemiologia de Pneumonia
Associada à Ventilação Mecânica por *Staphylococcus*
aureus em Unidade de Terapia Intensiva de Adultos

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção
do título de doutor

Lílian Alves Rocha

Dr. Paulo P. Gontijo Filho (orientador)

Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (co-orientadora)

Uberlândia

Junho - 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R672i Rocha, Lílian Alves, 1981-
2012 Importância do ambiente (ar e superfície) e das mãos de profissionais de saúde na epidemiologia de pneumonia associada à ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* em unidade de terapia intensiva de adultos / Lílian Alves Rocha. -- 2012.
79 f. : il.

Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia - Teses. 2. *Staphylococcus aureus* - Teses. 3. Infecção hospitalar - Teses. 4. Pneumonia - Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 579

Dedico esta tese

À Deus, minha família e amigos pelo apoio
sempre presente, tornando possível
a realização deste trabalho

*Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros foram.*

(Alexandre Graham Bell)

AGRADECIMENTOS

A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor. Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

Agradeço aos meus pais Geraldo e Aparecida pelo apoio sempre presente e amor incondicional, representando meu estímulo para continuar.

Ao meu irmão Leonardo por me apoiar durante toda a minha trajetória.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho pelo apoio, ensinamentos e exemplo profissional.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini pelo apoio e colaboração.

À Joseane Cristina pelo auxílio e prestatividade.

Ao meu amigo Michel pela amizade e por colaborar durante toda a execução deste trabalho.

Às minhas amigas Cristiane, Renata, Juliana, Karinne, Lizandra e Marcília que ficarão para sempre no coração. Sentirei saudades!

Aos meus companheiros Daiane, Nayara, Mariana, Sabrina, Everton, Raquel, Deivid, Ana Paula, Paola, Melina, Priscila e Ana Luiza e demais integrantes do Laboratório de Microbiologia.

Aos meus amigos Ana Paula Vieira, Laíta Alves, Marlon Caetano, Rosane Araújo, Daniele Azzalim, Daniella Sliwitch, Viviane Miranda, Isabel Cristina, Juarez Batista, Charles Spinola, Alan Vasconcelos, Sanderson Lima e Renata pelos momentos de alegria que tornaram a caminhada mais leve e por acreditarem em mim.

Aos companheiros Alessandra Pedrassani, Leonardo Cardoso, João Rogério, Alessandro Neres, Rozilda, Graciana, Oziel, Cícero, Cleuza e Dra. Margarete pela compreensão nos momentos de cansaço.

À Rute, Regina e Maria do Carmo por torcerem e intercederem por mim todo esse tempo!

Aos técnicos de laboratório Claudete, Ricardo e Samuel pela colaboração e amizade em todos esses anos.

Às secretárias da coordenação do PPIPA, Lucélia e Lucileide pela atenção, amizade e paciência.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia pela convivência, atenção e ensinamentos.

À Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas pela colaboração, paciência e acima de tudo pela sua amizade.

Aos professores, coordenação e colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela colaboração.

Aos membros da banca por aceitarem participar na defesa de tese.

Aos profissionais de saúde do Hospital de Clínicas, pacientes e seus responsáveis pela participação. A vocês o meu profundo respeito!

À todos que torceram por mim e me ajudaram direta ou indiretamente. Àqueles que acreditaram na minha profissão, no meu potencial principalmente quando nem eu mais acreditava. Sem vocês nada disso seria possível.

Obrigada a todos vocês!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma

µl: microlitro

µm: micrômetro

ABNT: Associação Brasileira de Normas e Técnicas

ARIMP: Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain and Heart Infusion*, Caldo Infusão Cérebro e Coração

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

ChI: Cloranfenicol

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm: centímetro

CVC: Cateter Vascular Central

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

Ery: Eritromicina

Gen: Gentamicina

HC: Hospital de Clínicas

HCl: Ácido Clorídrico

IC: Intervalo de Confiança

IH: Infecção Hospitalar

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: Milimolar

MRSA: *Oxacillin resistant Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

MSSA: *Oxacillin susceptible Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus*
sensível à oxacilina

NaCl: Cloreto de Sódio

ng: nanograma

NNISS: *National Nosocomial Infections Surveillance System*

°C: graus Celsius

OR: *odds ratio*

PAV: Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

pb: Pares de base

PBP: *Penicillin-binding proteins*, Proteínas Ligadoras de Penicilina

PCR: *Polimerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase

Pen: Pencilina

PFGE: *Pulsed-field gel electrophoresis*, Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

pmol: Picomol

Rif: Rifampicina

rpm: Rotações por minuto

SCC: *Staphylococcal Chromosome Cassette*, Cassete Cromossômico Estafilocócico

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SNE: Sonda Nosoentérica

SNG: Sonda Nasogástrica

SV: Sonda Vesical

Tet: Tetraciclina

Tmp: Sulfametoxazol/Trimetoprim

Tris: Hidroximetil amino metano

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

Van: Vancomicina

VM: Ventilação mecânica

χ^2 : qui-quadrado

β : Beta

γ : Gama

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Frequência de agentes etiológicos de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**31**
- Tabela 2:** Taxas de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados na UTI de adultos no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**32**
- Tabela 3:** Espectro de resistência aos antimicrobianos definido pelo método de disco difusão de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) internados na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**32**
- Tabela 4:** Evolução de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**33**
- Tabela 5:** Pacientes sob ventilação mecânica colonizados e/ou infectados por *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) ou resistente (MRSA) à oxacilina em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**35**
- Tabela 6:** Evolução clínica para pneumonia associada à ventilação (PAV) de pacientes sob ventilação mecânica com colonização nasal por *Staphylococcus aureus*, MSSA ou MRSA no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**36**
- Tabela 7:** Fatores de risco para colonização nasal por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**37**
- Tabela 8:** Análise multivariada dos fatores de risco para colonização nasal por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**38**
- Tabela 9:** Recuperação de *Staphylococcus aureus* de amostras de superfície ambiental próxima a pacientes colonizados e/ou infectados pelos métodos de “swab” e “wipe-rinse” na UTI de adultos do HC-UFU no período de Janeiro a Agosto 2010.....**41**
- Tabela 10:** Genótipos e perfis de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* da UTI de adultos do HC-UFU.....**47**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Organograma da população estudada quanto à colonização nasal e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Staphylococcus aureus*.....**30**
- Figura 2:** Frequência de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) tardias e precoces em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**31**
- Figura 3:** Distribuição mensal de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**34**
- Figura 4:** Tempo médio para o desenvolvimento de colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**35**
- Figura 5:** Correlação entre a recuperação de amostras de *Staphylococcus aureus* de superfícies ambientais com colonização ou pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**39**
- Figura 6:** Presença de *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) ou resistente (MRSA) à oxacilina em superfície ambiental, ar e mãos de profissionais de saúde na UTI de adultos do HC-UFU, período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**40**
- Figura 7:** Progressão espacial/temporal dos casos de pneumonia associada à ventilação na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.....**42**
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *mecA*.....**44**
- Figura 9:** Perfil de macrorestrição do DNA e dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE).....**45**
- Figura 10:** Perfil de macrorestrição do DNA e dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de isolados de *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE).....**46**
- Figura 11:** Evidências da transmissão de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) com perfil J na eletroforese em campo pulsado (PFGE) a partir do ambiente e mãos dos profissionais de saúde para pacientes na UTI de adultos do HC-UFU no período de Junho a Novembro de 2009.....**48**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Hospital	23
3.2 Termo de Consentimento e Comitê de Ética em Pesquisa	23
3.3 Desenho do estudo	23
3.4 Definições	24
3.5 Indicadores epidemiológicos	24
3.6 Aspirado traqueal	24
3.7 Pesquisa de colonização nasal	25
3.8 Amostragem microbiológica das mãos	25
3.9 Contaminação de superfícies	26
3.10 Contaminação do ar	26
3.11 Identificação do <i>S. aureus</i>	27
3.12 Estocagem das amostras	27
3.13 Determinação da sensibilidade aos antimicrobianos	27
3.14 Pesquisa do gene <i>mecA</i>	28
3.15 Tipagem molecular pela técnica de eletroforese em campo pulsado	30
3.16 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8. ANEXOS	77
8.1 Anexo I	77
8.2 Anexo II	78
8.3 Anexo III	79

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais frequentes na causa de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e a colonização nasal representa o principal fator de risco para o desenvolvimento subsequente de infecção por este microrganismo. O objetivo deste trabalho foi analisar a epidemiologia de PAV por *S. aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010. As PAVs foram definidas com base em critérios clínicos, radiológicos e contagem microbiológica $\geq 10^6$ UFC/mL no aspirado traqueal e os fatores de risco para colonização por MRSA foram determinados a partir de um estudo caso vs controle. A identificação do *S. aureus* foi realizada por testes microbiológicos convencionais e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco difusão. O genótipo *mecA* foi caracterizado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o perfil clonal pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Adicionalmente, 85% (873 de 1037) dos pacientes admitidos foram avaliados quanto à colonização nasal e amostras isoladas de ambiente (ar e superfície) e das mãos de profissionais de saúde foram também isoladas para análise. No total, 475 pacientes sob ventilação mecânica foram analisados e destes 21 (4,4%) evoluíram para PAV por *S. aureus*. As taxas de incidência de PAV e de PAV por *S. aureus* por 1000 pacientes-dia foram de 15,6 e 1,9, respectivamente. O fenótipo MRSA representou apenas 19% da etiologia das PAVs por *S. aureus* e destas todas foram consideradas tardias. Entre os pacientes investigados quanto à colonização nasal a frequência de *S. aureus* foi de 26,7%, com taxa de incidência de 21,6 por 1000 pacientes/dia. A colonização foi relacionada com o aumento na incidência de PAV por este microrganismo, de acordo com a correlação de Pearson. A colonização nasal foi um fator de risco estatisticamente significativo para o desenvolvimento desta infecção independente do fenótipo. Apesar de vários fatores de risco identificados para colonização por MRSA quando da análise univariada como: uso de antibióticos, tempo de colonização, diagnóstico de admissão e procedimentos invasivos, somente o uso de traqueostomia mostrou-se independentemente associado. A contaminação de superfícies ambientais com *S. aureus* foi detectada próxima a leitos de pacientes infectados ou colonizados numa frequência de 10,7%, apresentando correlação positiva. Frequência semelhante (8,2%) também foi observada nas mãos de profissionais de saúde. Relação temporal/espacial foi observada em cerca de metade (47,6%) dos pacientes com *S. aureus*. Os resultados mostraram a presença de uma diversidade de genótipos na unidade, com as 28 amostras testadas evidenciando 13 perfis de PFGE, 6 correspondendo ao MRSA e 7 ao MSSA. O mesmo perfil clonal foi observado em amostras correspondentes ao mesmo paciente incluindo colonização, infecção, ambiente e mãos de profissionais de saúde. A taxa de incidência de PAVs por *S. aureus* foi baixa com predomínio de casos por MSSA e a colonização nasal representou um fator de risco na evolução para PAV. Verificou-se a participação do ambiente como reservatório secundário para infecção por MRSA e houve evidências da transmissão cruzada na unidade.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, *Staphylococcus aureus*, Pneumonia associada à ventilação, Epidemiologia, UTI.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most common pathogens in the cause of ventilator-associated pneumonia (VAP) and nasal colonization is the major risk factor for subsequent development of infection by this organism. The aim of this study was to analyze the epidemiology of VAP by *S. aureus* resistant (MRSA) or sensitive (MSSA) to methicillin in patients admitted to the adult Intensive Care Unit of Hospital de Clinicas of Federal University of Uberlandia in the period between September 2008 and August 2010. The VAPs were defined based on clinical and radiological criteria and microbiological count $\geq 10^6$ UFC/mL in tracheal aspirate, and risk factors for MRSA colonization were determined from a study case versus control. The identification of *S. aureus* was performed by conventional microbiological tests, and the antimicrobial susceptibility profile was determined by a disk diffusion technique. The *mecA* gene was characterized by the technique of polymerase chain reaction (PCR) and clonal profile by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Additionally, 85% (873 of 1037) of the patients admitted were evaluated for nasal colonization and isolates of the environment (air and surface), and the hands of health care personal were also isolated for analysis. In total, 475 mechanically ventilated patients were analyzed and of these 21 (4.4%) progressed to VAP by *S. aureus*. The incidence rates of VAP and VAP by *S. aureus* per 1000 patients/day were 15.6 and 1.9, respectively. The MRSA phenotype represented only 19% of the etiology of VAPs *S. aureus*, and all these were considered late. Among the patients investigated for nasal colonization, the frequency of *S. aureus* was 26.7%, with an incidence of the 21.6 per 1000 patients/day. The colonization was associated with an increased incidence of VAP by this microorganism in accordance with Pearson's correlation. The nasal colonization was statistically significant risk factor for the development of this infection regardless of phenotype. Although several risk factors were identified for MRSA colonization in univariate analysis, such as antibiotics, colonization time, admission diagnosis, and invasive procedures, only the use of tracheostomy was independently associated. The environmental contamination of surfaces with *S. aureus* was detected near the beds of patients infected or colonized at a frequency of 10.7%, showing a positive correlation. A similar frequency (8.2%) was also observed in the hands of health care personal. The temporal/spatial relationship was observed in about half (47.6%) of the patients with *S. aureus*. The results showed the presence of a variety of genotypes in the unit; of the 28 samples tested, 13 PFGE profile were found, 6 corresponded to MSSA, and 7 to MRSA. The same clonal profile was observed in samples corresponding to the same patient including colonization, infection, environment, and the hands of health care professionals. The incidence of VAPs *S. aureus* was low with a predominance of cases by MSSA and nasal colonization represented a risk factor for VAP evolution. There was participation of the environment as a reservoir secondary to MRSA infection and there was evidence of cross-transmission in unit.

Keywords: Nosocomial infection, *Staphylococcus aureus*, Ventilator-associated pneumonia, Epidemiology, ICU.

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares (IHs) são reconhecidas como um dos mais importantes problemas de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento (KARABEY et al., 2002). No Brasil, permanecem grandes lacunas no conhecimento da epidemiologia das IHs e isso se deve às dimensões continentais do país e à diversidade dos hospitais em relação ao porte, natureza do financiamento, localização e afiliação a serviços de ensino (PEREIRA et al., 1996), além da falta de consolidação e divulgação de dados (TURRINI; SANTO, 2002).

As IHs estão relacionadas com alta morbidade e mortalidade e aumento significativo no tempo de hospitalização e custos de tratamento (ONEN et al., 2002). Estratégias para redução destas infecções são complexas, pois existem muitos fatores a serem considerados como os cuidados médicos, o ambiente hospitalar, as condições clínicas do paciente, o tipo de patógeno e uso de antimicrobianos (MEARS et al., 2009).

Entre os principais patógenos relacionados à etiologia das infecções nosocomiais estão: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (RUTALA et al., 2001).

As taxas de IHs são maiores em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), em função do volume intenso de trabalho, instabilidade clínica do paciente, tempo de internação, quantidade de procedimentos invasivos, tais como ventilação mecânica, cateterismo vascular central e sonda vesical (PITTET; HARBATH, 1998; PITTET et al., 1999). Adicionalmente, os pacientes críticos são usualmente imunocomprometidos e tem as barreiras representadas pela pele e mucosas rompidas por estes procedimentos invasivos. A freqüência de IHs na UTI é cerca de 3 a 5 vezes maior quando comparada às demais unidades do hospital (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ et al., 2006), representando a principal ocorrência adversa no cuidado com o paciente crítico (FORTALEZA et al., 2009).

Bactérias responsáveis pelas IHS nas UTIs podem se originar da microbiota endógena do paciente ou de fontes exógenas, sendo que a maioria dos patógenos transmitidos nestas unidades é proveniente de pacientes infectados e/ou colonizados (GRUNDMANN et al., 2005).

O paciente hospitalizado em UTI geralmente tem alteração na microbiota normal do trato respiratório superior, com substituição dos estreptococos α e γ hemolíticos, *Haemophilus* spp e bactérias anaeróbias por *Staphylococcus aureus* e bacilos gram-negativos entéricos tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e membros da família Enterobacteriaceae (SAFDAR et al., 2005; KOLLEF, 2005; PARK, 2005).

De acordo com estudos baseados no NNIS “National Nosocomial Infections Surveillance system” as síndromes infecciosas mais freqüentes em pacientes críticos são: pneumonias, infecções urinárias e infecções de corrente sangüínea (RICHARDS, 1999), situação observada no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) de acordo com estudo recente (CARVALHO, 2007). Dentre as pneumonias, destacam-se aquelas associadas à ventilação mecânica (PAVs) (SAFDAR et al., 2005; CHASTRE, 2005; TEJERINA et al., 2006), sendo considerada o tipo de IH mais comum em adultos internados em UTIs (SAFDAR et al., 2005; TEJERINA et al., 2006; PELEG; HOOPER, 2010), com consequente aumento no tempo de internação e mortalidade dos pacientes, fato que é agravado pela emergência de bactérias de difícil tratamento (GARCIN et al., 2010).

A PAV é definida como infecção pulmonar que ocorre a partir de 48 horas da intubação endotraqueal e ventilação mecânica (CHASTRE, 2005; KOLLEF, 2005; MOREIRA et al., 2009; XIE et al., 2011). O uso do tubo endotraqueal bem como o tempo de sua permanência está entre os fatores de risco que favorecem essa infecção pelo comprometimento das barreiras de defesa do trato respiratório inferior (SAFDAR, et al., 2005). Adicionalmente, destacam-se ainda idade avançada, tempo de internação prolongado, uso de antibióticos e fatores que comprometem o nível de consciência como a gravidade da doença (DAVIS, 2006; HUNTER, 2006; WANG et al., 2011).

O principal mecanismo na patogenia das pneumonias hospitalares é a microaspiração de secreções a partir da mucosa da oro e nasofaringe contaminada por patógenos hospitalares que colonizam estes sítios anatômicos, mas pode resultar ainda da aspiração de conteúdo gástrico, inalação de aerossóis

provenientes do respirador, e menos frequentemente da disseminação hematogênica de um foco de infecção distante ou de extensão direta de uma infecção no espaço pleural (KOLLEF, 2005; SAFDAR et al., 2005).

A incidência de PAV varia de 5 a 30% (GARCIN et al., 2010), dependendo da população estudada e dos critérios diagnósticos utilizados (ALP et al., 2004; SAFDAR et al., 2005). A casuística do NNISS mostra que o problema é maior em UTIs de pacientes adultos do que de crianças, com taxas de 4,7% nestas últimas e 34,4% na de adultos (JARVIS et al., 1991).

O risco de morte atribuído à PAV varia consideravelmente entre os estudos, de 0 a 50%, em função de aspectos como tratamento empírico muitas vezes inadequado, variedade das populações investigadas (NGUILE-MAKAO et al., 2010) e emergência de bactérias resistentes e multiresistentes (GARCIN et al., 2010).

Os agentes mais comuns como causadores de PAVs são *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* entre os bacilos gram-negativos e *S. aureus* entre os cocos gram-positivos (VINCENT, 2004; BOUZA et al., 2012). O grupo dos bacilos gram-negativos responde pela etiologia da maioria das PAVs, mas a frequência de cada patógeno varia ao longo do tempo e está relacionada, sobretudo ao uso de antimicrobianos e práticas de prevenção e controle de infecção (SILVA et al., 2006).

Os casos de infecções causadas pelo *S. aureus* se elevaram nas últimas duas décadas (LIBERT et al., 2008). Este microrganismo desperta interesse no mundo todo por ser um dos mais importantes na causa de infecções hospitalares (KORN et al., 2001; LAMERS et al., 2011) sendo o segundo mais frequentemente isolado de pacientes com infecção de trato respiratório inferior de acordo com estudo recente (ROSSI, 2011).

Este microrganismo é encontrado colonizando a pele e membranas mucosas e, embora vários sítios corporais possam ser colonizados, as narinas anteriores representam o principal nicho ecológico para esta espécie. Aproximadamente 20% da população humana sadia tem o *S. aureus* como microbiota residente e 80% de forma transitória. Com o aumento do risco de infecções entre os portadores nasais tem aumentado também a necessidade de intervenções para prevenção (DATTA; HUANG, 2008). Alguns hospitais têm utilizado terapia tópica na tentativa de eliminar a colonização e assim reduzir o risco de infecções, de transmissão para outros

pacientes e profissionais de saúde e a necessidade de isolamento do paciente portador (DRYDEN et al., 2004).

A frequência da colonização tende a ser aumentada em pacientes hospitalizados, sendo uma das justificativas o fato de que ocorre alteração na microbiota nasal quando o paciente está em uso sistêmico de antibióticos (KLUYTMANS et al., 1997). Nos hospitais, a colonização nasal pelo fenótipo sensível ou resistente à oxacilina do *S. aureus* tem sido identificada como o principal fator de risco para o desenvolvimento subsequente da maioria das infecções endógenas (BURIAN et al., 2010; SAFDAR; BRADLEY, 2008), desempenhando importante papel na epidemiologia e patogênese destas infecções (KLUYTMANS et al., 1997).

S. aureus com fenótipo resistente à oxacilina (MRSA) é um patógeno nosocomial associado a maior mortalidade e tempo de hospitalização (FLORÉ et al., 2010), particularmente em UTIs (RAINERI et al., 2007). O custo associado com o tratamento de infecções causadas por MRSA é mais alto quando comparado àquelas causadas por *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina (MSSA) (MARTINEZ-CAPOLINO et al., 2010).

O MRSA caracteriza-se como produtor de uma proteína ligadora específica de baixa afinidade com os β -lactâmicos chamada proteína ligadora de penicilina (PBP2a do inglês *Penicillin-binding protein*), codificada pelo gene cromossômico *mecA* carregado por elemento móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico (SCC: *Staphylococcal chromosome cassette*) (DURENBERG; STOBBERINGH, 2008; IBRAHEM et al., 2009; SCHUENCK et al., 2009).

A incidência de MRSA entre as infecções por *S. aureus* varia entre os diferentes países, hospitais e unidades (LESKI et al., 1999), sendo mais alta em UTIs (CEPEDA et al., 2005) fato também relatado no Brasil (ROSSI, 2011), com prevalência em estudos conduzidos no Rio Grande do Sul e Paraná de 86,7% e 42,0%, respectivamente (CARRILHO, 1999).

De acordo com o SENTRY, o MRSA permanece como o principal patógeno causador de infecções nosocomiais em países em desenvolvimento e na América Latina, sendo endêmico nos hospitais brasileiros (SADER et al., 2004; SANTOS et al., 2010). Nos Estados Unidos, a frequência das infecções causadas pelo MRSA foi de cerca de 50% em 2004 segundo dados do sistema de vigilância da “National Nosocomial Infections Surveillance System” (NNISS)(LIN et al., 2007) e nas

unidades de terapia intensiva superou esta prevalência (NNISS, 2001). A situação das UTIs brasileiras é semelhante (FORTALEZA et al., 2009), assim como nas de hospitais europeus como em Portugal, Itália, Grécia e Turquia (KOTILAINEN et al., 2003). Na UTI de adultos do HC-UFU verificou-se variação nas taxas com declínios e reemergências na última década, justificada pelo uso de antimicrobianos (CARDOSO, 2007; MOREIRA, 2008), insuficiência de medidas de prevenção e controle incluindo, sobretudo a precariedade da higiene das mãos (BORGES, 2009).

Os fatores de risco para aquisição nosocomial por MRSA incluem: pré-tratamento com antibióticos, uso de procedimentos invasivos, tempo prolongado de internação e exposição dos pacientes ao microrganismo (WANG et al., 2011).

Nos hospitais os principais reservatórios de MRSA são pacientes colonizados ou infectados e tem sido bem documentado que o principal mecanismo de disseminação são as mãos dos profissionais de saúde contaminadas no exercício da função (HOTA, 2004; HARDY et al., 2006). A higiene das mãos é um dos elementos mais importantes na prevenção das infecções por microrganismos resistentes como MRSA (CREAMER et al., 2010). Entretanto, estudos mostram que a adesão a esta prática é baixa na maioria das instituições (PITTET, 2001; GAGNÉ et al., 2010) particularmente na UTI, unidade onde é ainda mais necessária (BORGES, 2009), sendo que a alta carga de trabalho e o tempo insuficiente estão relacionados a este fato (McARDLE et al., 2006).

As medidas para controle da transmissão nosocomial de MRSA incluem vigilância epidemiológica, isolamento de pacientes infectados ou colonizados e, sobretudo precauções com barreiras como o uso obrigatório de avental, luvas e gorro, lavagem das mãos antes e após contato com o paciente, educação dos profissionais de saúde, restrição no uso de antimicrobianos de amplo espectro, triagem de pacientes de alto risco e limpeza do ambiente hospitalar (BOYCE, 2001; SEXTON et al., 2006; TACCONELLI, 2009).

Embora a principal via de transmissão de MRSA seja as mãos dos profissionais de saúde a partir de pacientes infectados e/ou colonizados (KASSEM et al., 2011) as superfícies contaminadas das enfermarias localizadas próximas aos pacientes podem representar um reservatório potencial deste microrganismo (HEDIN et al., 2010). Desta forma, esta bactéria pode ser isolada de superfícies como piso, mobiliário e equipamentos médicos (NERANDIZIC et al., 2010).

A transmissão por via aerógena é geralmente menos frequente do que por contato direto, porém a presença de MRSA em aerossóis pode resultar em infecções (SHIOMORI et al., 2002). A importância do ar tanto na contaminação das superfícies quanto da mucosa do trato respiratório superior deve ser considerada levando em conta a frequência deste microrganismo durante a arrumação dos leitos e da possibilidade de contaminação das mãos dos profissionais de saúde (SHIOMORI et al., 2002; LEMMEN et al., 2004). A questão é ainda mais importante em unidades críticas onde a contaminação ambiental por bactérias resistentes é mais expressiva em função da maior densidade de pacientes infectados e/ou colonizados e profissionais de saúde (LIVESLY et al., 1998).

Existem evidências de que a contaminação do ambiente com MRSA seria suficiente para contaminar as mãos ou luvas dos profissionais de saúde com consequente transmissão para os pacientes (HARDY et al., 2006). Desta forma, a detecção de *S. aureus* no ambiente hospitalar é importante para avaliar o seu papel como reservatório potencial na aquisição de infecções estafilocócicas (KASSEM et al., 2011).

Para o sucesso de uma investigação epidemiológica é necessário um indicador seguro da relação entre os microrganismos isolados, ou seja, um esquema de tipagem que envolva técnicas convencionais e moleculares. As técnicas genotípicas, de uma maneira geral, apresentam alta tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório das linhagens bacterianas, mas são impraticáveis na rotina laboratorial (TOMPKINS; FALKOW, 1992).

Nos estudos de epidemiologia hospitalar das infecções por MRSA, entre as técnicas moleculares mais recomendadas incluem, principalmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) em função de características inerentes a esta metodologia, incluindo a facilidade na execução (WELLER, 2000) e a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) que é considerada por muitos pesquisadores como padrão ouro para tipagem de *S. aureus* (DURENBERG; STOBBERINGH, 2008; CHAMBERS; DELEO, 2009).

De acordo com o exposto, avaliar a participação de *S. aureus* em IHS graves como as PAVs é de grande importância, uma vez que este microrganismo é endêmico no HC-UFU como demonstrado em estudos realizados nessa instituição, fato que justifica avaliar melhor sua epidemiologia neste hospital. Neste contexto, embora o ambiente seja considerado um reservatório secundário na epidemiologia

de IHS, o nível de contaminação de superfícies não pode ser negligenciado, assim como a participação das mãos dos profissionais de saúde. Com a entrada de novos clones de MRSA nos hospitais brasileiros torna-se extremamente relevante para a saúde pública a análise e caracterização fenotípica e genotípica destas amostras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a epidemiologia de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a incidência de PAV e definir os agentes etiológicos associados;
- ✓ Determinar a colonização nasal por *S. aureus* e sua relação com episódio subsequente de PAV;
- ✓ Analisar os fatores de risco intrínsecos e extrínsecos para colonização por MRSA;
- ✓ Avaliar a contaminação das mãos de profissionais de saúde;
- ✓ Verificar a presença de *S. aureus* no ar e em superfícies passíveis de contaminação das mãos de profissionais de saúde;
- ✓ Definir o genótipo *mecA*;
- ✓ Definir a natureza clonal de amostras isoladas de colonização, infecção, ambiente e mãos de profissionais de saúde por meio de genotipagem por PFGE e analisar quanto:
 - Relação entre colonização e infecção
 - Transmissão horizontal
 - Ocorrência de disseminação clonal
 - Papel potencial de fontes ambientais como reservatório

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hospital

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um hospital de ensino, com 550 leitos, que oferece nível terciário de atendimento. A Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de adultos é uma unidade mista, clínico-cirúrgica apresentando no período do estudo 15 leitos.

3.2 Termo de Consentimento e Comitê de Ética em Pesquisa

Antes da coleta todos os pacientes incluídos no estudo ou seus responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos do trabalho proposto e a coleta realizou-se mediante a concordância e assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I).

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia sob o número 298/07 (Anexo II).

3.3 Desenho do Estudo

Foram utilizados dois modelos de estudo na UTI de adultos do HC-UFU no período de setembro de 2008 a agosto de 2010: coorte, onde foi calculada a taxa de densidade de incidência de PAVs adquiridas na UTI por *S. aureus* (MRSA ou MSSA) por meio de sistema de busca ativa com visitas regulares na unidade onde foi preenchida uma ficha contendo dados demográficos, clínicos e epidemiológicos para cada paciente (Anexo III) e caso vs controle (incluindo como casos pacientes colonizados por MRSA e controles aqueles colonizados por MSSA) onde a taxa de densidade de incidência de colonização por *S. aureus* foi determinada.

3.4 Definições

Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV)

Os pacientes com PAV foram aqueles que estavam sob ventilação mecânica por período ≥ 48 horas que apresentaram desenvolvimento de infiltrado radiológico novo e/ou progressivo e pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos/laboratoriais: secreção respiratória purulenta, temperatura maior que 38,5°C ou menor que 35°C, contagem de leucócitos maior que 10000/ μ l com desvio à esquerda ou menor que 3000/ μ l e cultura quantitativa de aspirado traqueal com contagem $\geq 10^6$ UFC/mL (ALP; VOSS, 2006; XIE et al., 2011).

PAVs precoces e tardias

As PAVs precoces ocorreram em até 4 dias após o início do uso da prótese ventilatória e as tardias após esse período (RELLO et al., 2006; HUNTER, 2006).

3.5 Indicadores epidemiológicos

Foram considerados os seguintes indicadores epidemiológicos:

PAV/1000 pacientes-dia: Número total de PAV/Número pacientes-dia^A x 1000 (KURUP et al., 2010).

Colonização/1000 pacientes-dia: Número total de colonizados/Número pacientes-dia^A x 1000 (RAINERI et al., 2007)

^A**Pacientes-dia:** $P \times L \times T$

P = Período de tempo de observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

T = Índice de ocupação no tempo considerado.

3.6 Aspirado traqueal

3.6.1 Coleta de aspirado traqueal

Foi realizada em pacientes com suspeita clínica de pneumonia associada à ventilação mecânica.

O espécime clínico foi coletado por meio de sonda n° 12, durante o procedimento de aspiração da árvore respiratória, no início da manhã, pelos profissionais de saúde da unidade (fisioterapeutas e enfermeiros), e transportado em tubo esterilizado para o laboratório de Microbiologia (ARIMP – Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia).

3.6.2 Cultivo

O aspirado traqueal foi diluído nos volumes de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em solução fisiológica esterilizada e volumes de 0,1 mL destas diluições foram inoculados em Ágar Manitol Salgado (Difco, Maryland, USA) e incubados a 37°C por 24 a 48 horas, para determinação do número de UFC/mL. Considerou-se positivo para PAV o aspirado traqueal com crescimento de *S. aureus* $\geq 10^6$ UFC/mL (TEIXEIRA et al., 2004).

3.7 Pesquisa de colonização nasal

Realizou-se cultura de vigilância para pesquisa de colonização nasal por *S. aureus* nas primeiras 48 horas de internação do paciente e semanalmente até alta ou óbito ou até a confirmação da positividade (MARTINEZ-CAPOLINO et al., 2010). A coleta foi realizada com swab e o material acondicionado em tubo de ensaio contendo 1mL de Caldo Trypticase Soja (Difco, Maryland, USA) com 4% de NaCl, incubado “overnight” a 37°C e, após agitação em “vórtex”, a suspensão inoculada em Agar Manitol Salgado (Difco, Maryland, USA), com incubação a 37°C por 24 a 48 horas.

3.8 Amostragem microbiológica das mãos

A mão dominante (enluvada ou não) do profissional de saúde foi coletada por meio da técnica de dígito-pressão em placa de Petri contendo Ágar Manitol Salgado (Difco, Maryland, USA), durante o contato de 60 segundos (SOUZA, 2009; FERREIRA; ANDRADE, 2010; OLIVEIRA et al., 2010). A coleta do material para análise microbiológica aconteceu após manipulação de fonte potencial de

contaminação (fluidos, secreções, mucosas, pele não intacta) em pacientes colonizados ou apresentando episódio de PAV por *S. aureus*.

3.9 Contaminação de superfícies

As superfícies próximas ao paciente (mesa de cabeceira e grade da cama) foram monitoradas microbiologicamente quanto à presença de *S. aureus*, considerando leitos ocupados por pacientes colonizados e/ou infectados por este microrganismo.

As superfícies foram amostradas utilizando-se as técnicas: “swab” no período de setembro de 2008 a agosto de 2010 e a técnica de “wipe-rinse” no período de janeiro de 2010 a agosto de 2010.

Para a técnica de “wipe-rinse” foi utilizado tecido estéril (7cm x 7cm) pré-umedecido com solução fisiológica estéril que foi pressionado na superfície (AL-HAMAD; MAXWELL, 2008) e transferido para um recipiente com 10mL de BHI (Biobrás, Brasil), incubado “overnight” a 37°C e, após agitação em “vórtex” a suspensão resultante foi inoculada em Agar Manitol Salgado (Difco, Maryland, USA), com incubação a 37°C por 24 – 48 horas (AL-HAMAD; MAXWELL, 2008).

O swab foi acondicionado em tubo de ensaio contendo 1mL de Caldo Trypticase Soja (Difco, Maryland, USA) com 4% de NaCl e incubado “overnight” a 37°C e, após agitação em “vórtex”, a suspensão inoculada em Agar Manitol Salgado (Difco, Maryland, USA) seguindo-se incubação a 37°C por 24-48 horas.

3.10 Contaminação do ar

Placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo Ágar Manitol Salgado (Difco, Maryland, USA) foram expostas no quarto de pacientes colonizados ou infectados por *S. aureus* e em área comun (sala de prescrição), pelo período de uma hora (QUADROS, 2008). Após este período, as placas foram incubadas a 37°C por 24 – 48 horas.

3.11 Identificação do *S. aureus*

As colônias suspeitas de *S. aureus* foram identificadas pelas características morfo-tintoriais (coloração de Gram), seguido da detecção da produção das enzimas catalase e coagulase livre (KONEMAN et al., 2001).

3.11.1 – Produção de catalase

A produção da enzima catalase foi verificada em lâmina de microscopia através da mistura de solução de peróxido de hidrogênio a 3% e uma ou duas colônias bacterianas. A produção de bolhas foi interpretada como teste positivo.

3.11.2 – Teste de coagulase livre

O teste da coagulase livre foi realizado a partir da inoculação de 2 a 3 colônias da amostra em tubo contendo 0,5mL de BHI (Biobrás, Brasil) e incubação a 37°C por 24 horas. A seguir, adicionou-se 0,5mL de plasma de coelho (Laborclin, Brasil) diluído 1:4 em solução fisiológica estéril e novamente incubado a 37°C por 24 horas. A produção ou não de coágulo foi verificada no tempo de 4 horas de incubação a 37°C e a confirmação de um resultado negativo em até 24 horas. A amostra padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

3.12 Estocagem das amostras

Todas as amostras identificadas como *S. aureus* foram estocadas em BHI (Biobrás, Brasil) com 20% de glicerol à -20°C.

3.13 Determinação da sensibilidade aos antimicrobianos

3.13.1 Teste de triagem em agar incorporado com oxacilina e NaCl

As amostras de *S. aureus* foram cultivadas em Ágar Mueller-Hinton (Micromed, Brasil) com 6 µg/mL de oxacilina (Sigma, St. Louis, USA) e 4% de NaCl de acordo com o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009). A amostra padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

3.13.2 Teste de Disco Difusão

As amostras de pacientes com colonização e infecção por *S. aureus*, assim como recuperadas de superfície, ar e mãos dos profissionais de saúde foram

submetidas ao teste de disco difusão “*in vitro*”, seguindo-se a metodologia do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009). As amostras estocadas foram subcultivadas em Ágar Trypticase Soja (Biobrás, Brasil) pela técnica de esgotamento e incubadas a 37°C por 24 horas. A seguir, cerca de 3 a 5 colônias foram semeadas em tubo com 5 mL de Caldo Trypticase Soja (Difco, Maryland, USA) com incubação por 18 a 24 horas até atingir turvação equivalente à escala 0,5 da escala de MacFarland, correspondente à concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL e a suspensão foi semeada com swab na superfície de placa de Agar Mueller-Hinton (Micromed, Brasil) de modo a obter crescimento confluyente. Em seguida, foram adicionados os discos de antibióticos e feita incubação por 24 horas a 37°C. A sensibilidade ou resistência foi determinada pelo diâmetro do halo de inibição formado em torno dos seguintes discos de antimicrobianos: clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), penicilina (10µg), oxacilina (1µg), cefepime (30µg), rifampicina (30µg), cloranfenicol (30µg), vancomicina (30µg), ciprofloxacina (5µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg) (Laborclin, Brasil). A amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

3.14 Pesquisa do gene *mecA*

3.14.1 Extração de DNA

A amostra foi cultivada em tubo com 10mL de BHI (Oxoid) à 37°C, por 18 horas e a suspensão resultante centrifugada a 5600 xg por 5 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano lavado com 10mL de solução fisiológica previamente esterilizada. A seguir adicionou-se o mesmo volume de pérolas de vidro (~600µm de diâmetro), previamente tratadas com ácido nítrico.

O tratamento das pérolas de vidro foi feito pela imersão das mesmas em solução de ácido nítrico (50%, w/v) por 2 horas, sob agitação para remover metais pesados que atuam como co-fatores para nucleases (DNases e RNases). Em seguida, as pérolas foram lavadas 10 vezes em água, com intervalos de 30 minutos e mantidas, por 18 horas, em solução de dietilpirocarbonato (DEPC 1%, w/v) a 37°C,

e em seguida secas por 2 horas, 180°C. A solução de DEPC tem a função de degradar contaminantes com atividade de DNase e RNase.

Após a adição de pérolas de vidro foi adicionado, ao sedimento bacteriano, a solução de lise (Tris-HCl 0,2 M pH 8,5; NaCl 1,5%; EDTA 25 mM pH8; SDS 0,5% em água destilada) na proporção 1:3, ou seja, um volume de solução de lise correspondente a 3X o volume de sedimento bacteriano. Esta última solução foi preparada previamente e mantida à 4°C. A mistura, sedimento bacteriano, solução de lise e pérolas de vidro foi agitada, vigorosamente, em agitador mecânico, por 10 minutos.

Um volume de 500µL de cada extração foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, ao qual adicionou-se o mesmo volume de mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, para eliminar as proteínas contidas na mistura. O material contido em cada tubo foi homogeneizado, por inversão, e centrifugado a 16000xg por 15 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo e o DNA precipitado com isopropanol absoluto, na proporção 1:1, e mantido à temperatura de -20°C, por 18 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados a 16000 xg por 10 minutos, à temperatura de 4°C, o sobrenadante desprezado e os tubos mantidos em câmara de fluxo laminar para secagem de DNA.

Após a secagem, o DNA foi suspenso em 50µL de água ultra-pura (W-PCR, Sigma) mantido a 4°C por 18 horas. Posteriormente, o DNA foi tratado com 1µL de solução de RNase (1 mg/mL) e mantido a 37°C, por 1 hora. Finalmente, o produto da extração foi quantificado utilizando-se o equipamento GeneQuant (Amersham Bioscience) e mantido a -20°C, até o momento do uso.

3.14.2 Técnica de PCR

A técnica de PCR foi realizada para um volume de 25µL adicionando-se: 60ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos, 2,5µL de tampão PCR 10X concentrado, 2,0 mM de solução de MgCl₂, 0,625U de Taq DNA polimerase, 25 pmol de cada um dos primers (*mecA1*: 5'CTCAGGTACTGCTATCCACC3' e *mecA2*: 5'CACTTGGTATATCTTCACC3') e água ultra-pura q.s.p. 25µL (Sigma). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos (94°C por 60s; 52°C por 30s e 72°C por 30s) e extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1%, seguido-se eletroforese a 90 V e coloração com brometo de etídio (1 µg/mL). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas Biosciences). O tempo de eletroforese variou em função do tamanho do gel utilizado.

3.15 Tipagem molecular pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A escolha dos isolados para esta análise foi baseada no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a relação temporal dos pacientes dos quais foram recuperados. No total, foram incluídas 28 amostras de *S. aureus* das quais oito de infecção, nove de colonização nasal, cinco de superfície, uma de ar e cinco de mãos de profissionais de saúde. Os isolados foram analisados quanto ao perfil de macrorestrição do crDNA com enzima *Sma*I.

As amostras foram inoculadas em tubo com 5 mL de caldo BHI (Oxoid) e incubadas a 37°C durante 18 horas sob agitação constante, de modo a atingir a sua fase exponencial de crescimento, quando uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 2 minutos a 12.000 rpm a 4°C. As células foram lavadas em 500µL de PIV (10Mm Tris, 1,0M NaCl), novamente centrifugadas, e o sobrenadante descartado. O “pellet” foi suspenso em 200µL de PIV e 150µL transferidos para um novo tubo eppendorf, colocado em banho de água a 48°C por 5 a 10 minutos para o equilíbrio da temperatura. Em seguida, 150µL de agarose (1,5% *Agarose Ultra Pure*), foram adicionados rapidamente ao tubo. Os discos de agarose foram feitos e colocados em uma solução de lise EC (6mM Tris, pH 8,0; 1M NaCl; 100mM EDTA, 0,2% deoxicolato de sódio e; 0,5% Na lauryl sacarsina; 0,5% Brij 58) acrescentado-se RNase a uma concentração final de 20µg/mL e incubados por 4 a 5 horas a 37°C. Ao final deste período, o tampão EC foi substituído por tampão ES (EDTA pH 9, sarcosil 1%) acrescido de proteinase K, incubando-se por um período de 18-24 horas a 50°C. Os discos de agarose foram lavados 5 vezes com 13mL do tampão TE 1x (10Mm Tris, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0), sendo de 30 minutos o tempo. Um único disco foi colocado em 100µL de tampão 1x e deixado à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por tampão fresco e adicionado 30 unidades de enzima de restrição

SmaI, seguindo-se incubação em banho de água por 18 a 20 horas a 30°C. Foi preparado 100mL de gel a 1% (*Agarose Ultra Pure*) em TBE 0,5x (0,89M Tris; 0,89 ácido bórico; 0,25 EDTA, pH 8.0).

A eletroforese foi realizada em aparelho Chef DRIII System (Bio Rad), utilizando-se solução tamponante TBE 0,5x e à temperatura de 14°C por 20 horas, com pulsos de 5 a 40 segundos por 20 horas, 200V, com ângulo de 120°. Após esse procedimento o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) por 30 minutos, descorado em água destilada por 30 minutos e fotografado pelo sistema de fotodocumentação Alphamager (Alpha Innotech).

Os padrões de PFGE foram observados visualmente e considerados idênticos quando da coincidência de todas as bandas, similares (subtipos) se diferirem em uma ou duas bandas claramente visíveis e diferentes quando da diferença em três ou mais bandas (TENOVER et al., 1997).

3.16 Análise Estatística

Na análise estatística univariada dos fatores de risco utilizou-se o teste do χ^2 e quando o $n < 5$ o teste exato de Fisher foi adotado por meio de tabelas de contingência do tipo dois por dois (2 x 2). As variáveis que demonstraram medidas de associação altas (*odds ratio*) com valor de $p \leq 0,05$ foram submetidas à análise multivariada através de modelo de regressão logística. Para análise de correlação utilizou-se o coeficiente de Pearson. A significância estatística foi definida por um valor de $p \leq 0,05$. A análise das variáveis foi realizada utilizando-se os programas estatísticos SPSS PC versão 17.0 (SPSS, Chicago) e o Epi-Info Software versão 2000 (CDC, Atlanta).

4. RESULTADOS

Durante o período de setembro/2008 a agosto/2010 realizou-se vigilância da incidência de PAV por *S. aureus* na UTI de adultos do HC-UFU. Os pacientes foram analisados quanto à colonização nasal e adicionalmente amostras de ambiente (ar e superfície) e mãos de profissionais de saúde foram coletadas.

Nesse período foi admitido um total de 1037 pacientes, 475 (45,8%) submetidos à ventilação mecânica e destes 168 (35,4%) desenvolveram PAV (Figura 1). Na maioria dos casos (86,3%) predominou bacilos gram-negativos como agente etiológico, com destaque para não fermentadores (78,6%) sendo *Pseudomonas aeruginosa* o microrganismo mais frequente (48,2%). *S. aureus* foi responsável por 12,5% dos episódios de PAV, com predomínio de pneumonias tardias (61,9%). A tabela 1 evidencia os agentes etiológicos de PAV neste período e a figura 2 a distribuição dos episódios de PAVs em precoces e tardios.

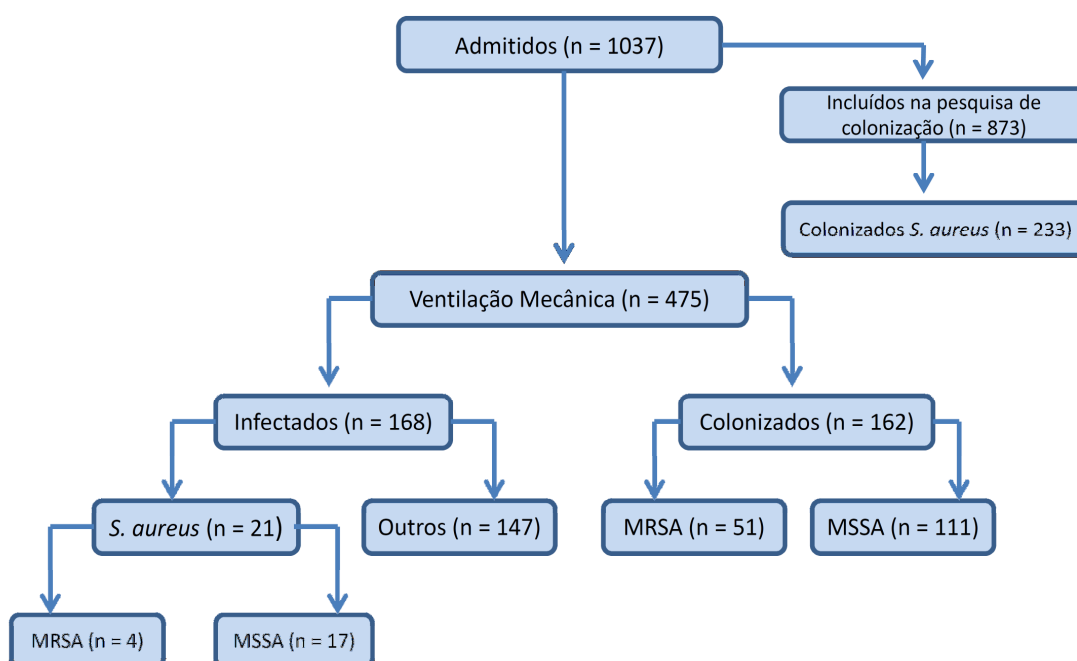


Figura 1: Organograma da população estudada quanto à colonização nasal e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Staphylococcus aureus*.

Tabela 1: Frequência de agentes etiológicos de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de setembro de 2008 a agosto de 2010.

Microrganismo	N= 168 (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55 (32,7)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	42 (25,0)
Outros não fermentadores	17 (10,1)
Enterobacteriaceae	31 (18,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	21 (12,5)
MRSA	4 (19,0)
MSSA	17 (81,0)
<i>Staphylococcus Coagulase Negativo</i>	01 (0,6)
<i>Candida sp.</i>	01 (0,6)

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina.

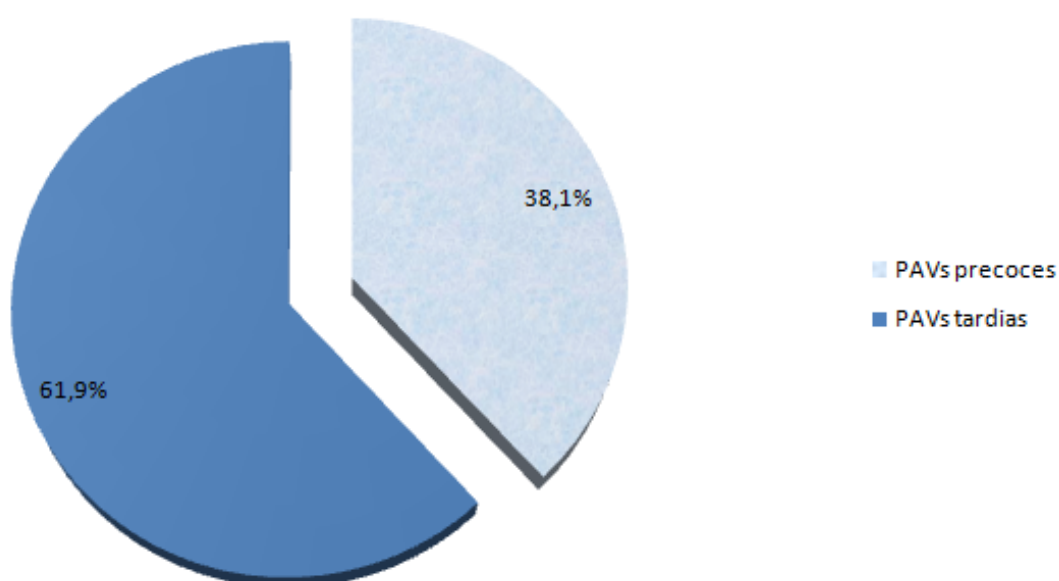


Figura 2: Frequência de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) tardias e precoces em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

As taxas de pneumonia associada à ventilação mecânica estão na tabela 2, verificando taxa de incidência de PAV e de PAV por *S. aureus* por 1000 pacientes-dia de 15,6 e 1,9, respectivamente.

Tabela 2: Taxas de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados na UTI de adultos no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

Variável	Taxa
PAV / 1000 pacientes dia	15,6
PAV por <i>S. aureus</i> / 1000 pacientes dia	1,9
PAV por MRSA / 1000 pacientes dia	0,4
PAV por MSSA / 1000 pacientes dia	1,6

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina.

Em relação aos padrões de resistência dos 21 isolados de *S. aureus* de PAV, observou-se que o fenótipo MRSA foi menos frequente (19,0%) com sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados, com destaque para rifampicina (100,0%), cloranfenicol (100,0%) e vancomicina (100,0%) (Tabela 3).

Tabela 3: Espectro de resistência aos antimicrobianos pelo método de disco difusão de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) internados na UTI de adultos do HC-UFU no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

Antimicrobiano	Sensível N (%)	Resistente N (%)
Clindamicina	17 (81,0)	4 (19,0)
Eritromicina	15 (71,4)	6 (28,6)
Penicilina	4 (19,0)	17 (81,0)
Oxacilina	17 (81,0)	4 (19,0)
Cefepime	17 (81,0)	4 (19,0)
Rifampicina	21 (100,0)	0 (0)
Cloranfenicol	21 (100,0)	0 (0)
Vancomicina	21 (100,0)	0 (0)
Ciprofloxacina	17 (81,0)	4 (19,0)
Sulfametoxazol -Trimetoprim	17 (81,0)	4 (19,0)
Tetraciclina	14 (66,7)	7 (33,3)
Gentamicina	17 (81,0)	4 (19,0)

A taxa de mortalidade foi maior no grupo de pacientes que desenvolveu PAV por MRSA (50,0%) do que no grupo com MSSA (23,5%), mas sem diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 4: Evolução de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

Microrganismo	Infectados	Mortalidade ^c
	N (%)	N (%)
MRSA ^a	4 (19,0)	2 (33,3)
MSSA ^b	17 (81,0)	4 (66,7)
Total	21 (100,0)	6 (100,0)

P

a x b x c = 0,54 (OR: 3,25; IC_{95%}:0,22 – 53,45)

Entre os pacientes submetidos à análise de colonização, a frequência de positividade para *S. aureus* foi de 26,7% (233 de 873), com taxa de incidência de 21,6 por 1000 pacientes-dia. A pressão dessa colonização foi relacionada ao aumento na incidência de PAV por este microrganismo de acordo com a correlação de Pearson (Figura 3).

Nos pacientes em uso de ventilação mecânica, a taxa de colonização por *S. aureus* foi de 34,1% com frequência importante do fenótipo MRSA (31,5%). A maioria dos pacientes (62,7%) não chegou colonizada na UTI e entre estes que adquiriram o microrganismo na unidade a maioria ocorreu na primeira semana seguinte à internação. Na figura 4 estão relacionados os pacientes colonizados por *S. aureus* na narina de acordo com o momento das coletas e na tabela 5 o número de pacientes ventilados que desenvolveram infecção ou colonização por este microrganismo.

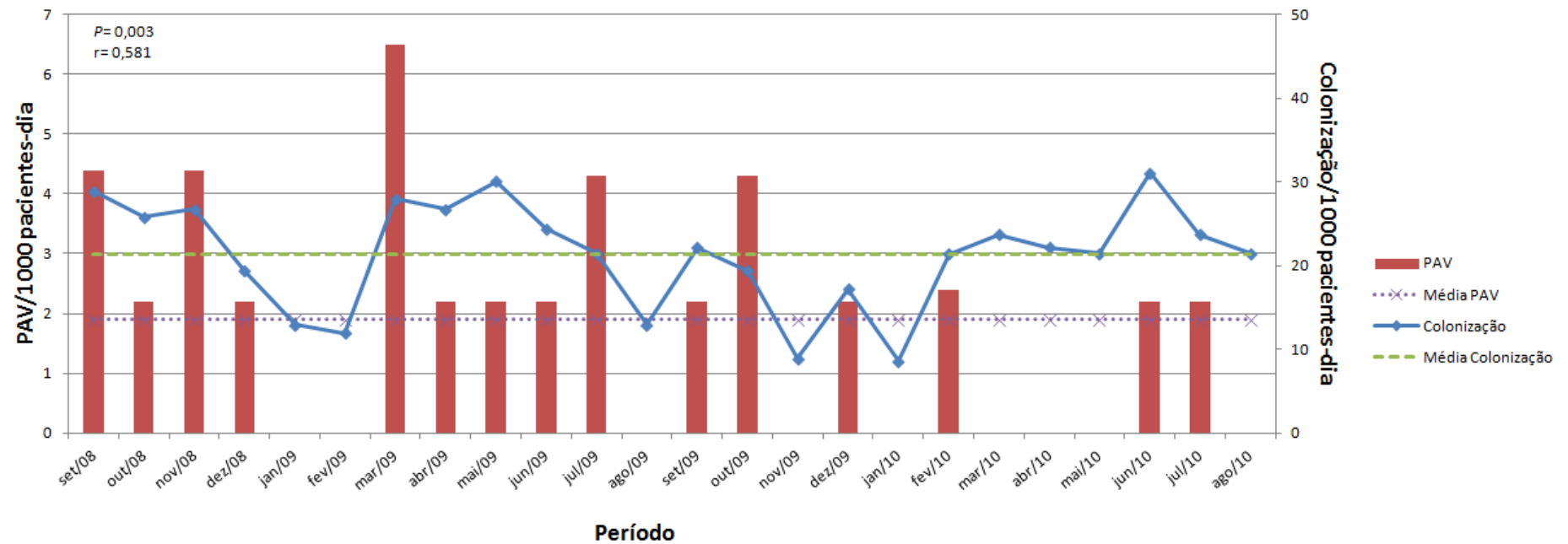


Figura 3: Distribuição mensal de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

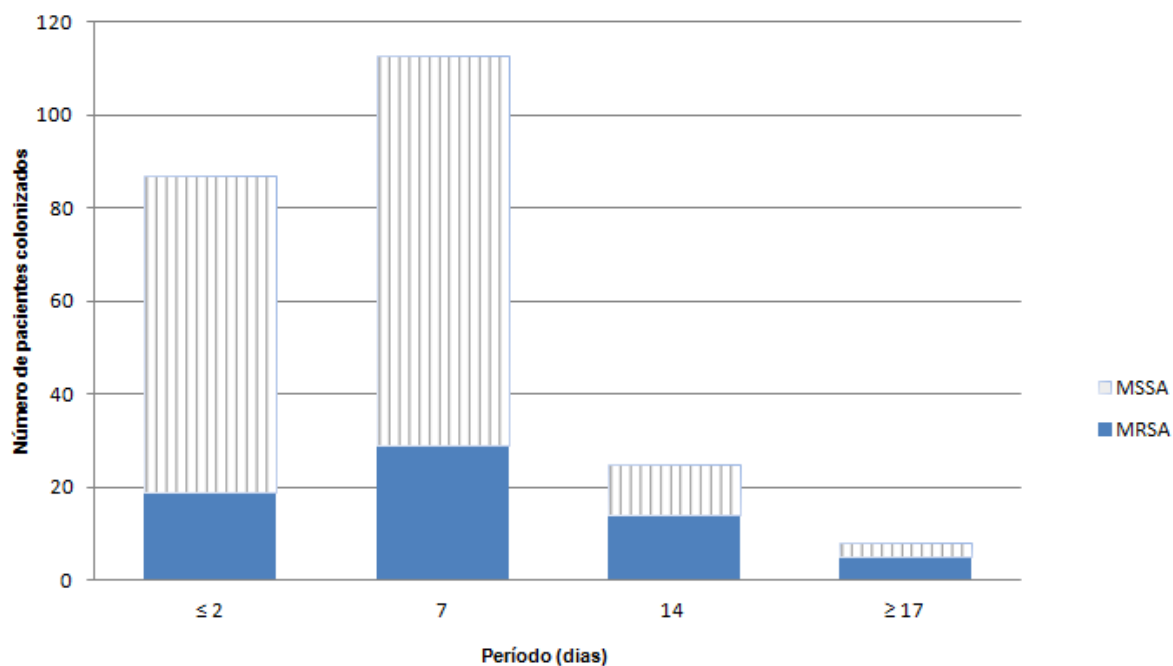


Figura 4: Tempo médio para o desenvolvimento de colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

Tabela 5: Pacientes sob ventilação mecânica colonizados e/ou infectados por *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) ou resistente (MRSA) à oxacilina em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

	Infecção	Colonização
	N= 21 (%)	N= 162
MRSA	4 (19,0)	51 (31,5)
MSSA	17 (81,0)	111 (68,5)

Embora a ocorrência de PAVs por *S. aureus* não seja expressiva, observou-se que a colonização nasal foi um fator de risco importante para o desenvolvimento da infecção independente do fenótipo. A tabela 6 compara a evolução clínica dos pacientes colonizados com MRSA, MSSA com e sem PAV por *S. aureus*.

Tabela 6: Evolução clínica para pneumonia associada à ventilação (PAV) de pacientes sob ventilação mecânica com colonização nasal por *Staphylococcus aureus*, MSSA ou MRSA no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

	Colonizados N (%)	Não Colonizados N (%)	<i>p</i>	OR (IC _{95%})
<i>S. aureus</i>				
Total	162 (100,0)	313 (100,0)	0,04*	2,70 (1,03 – 7,14)
PAV	12 (7,4)	9 (2,9)		
MRSA				
Total	51 (100,0)	424 (100,0)	0,05*	8,61 (0,84 – 87,86)
PAV	2 (3,9)	2 (0,5)		
MSSA				
Total	111 (100,0)	364 (100,0)	0,001*	5,05 (1,72 – 15,13)
PAV	10 (9,0)	7 (1,9)		

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina; OR: odds ratio; IC intervalo de confiança; *estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).

A avaliação dos fatores de risco para colonização por MRSA foi feita por meio de estudo caso (pacientes ventilados colonizados por MRSA) vs controle (pacientes ventilados colonizados por MSSA). Os resultados da análise univariada e da regressão logística dos fatores de risco intrínsecos e extrínsecos associados à colonização por MRSA são mostrados nas tabelas 7 e 8. Na análise univariada, o diagnóstico de admissão clínico ($P=0,007$; OR=2,64), tempo de colonização igual ou superior a 7 dias ($P=0,001$; OR=3,33), presença de traqueostomia ($P=0,005$; OR=3,88) e uso de carbapenêmicos ($P=0,01$; OR=2,64) mostraram diferenças significantes entre os dois grupos. Entretanto, quando da análise multivariada, o único fator de risco independente para colonização por MRSA foi a presença de traqueostomia.

Tabela 7: Fatores de risco para colonização nasal por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

	MRSA N= 51 (%)	MSSA N= 111 (%)	P	OR (IC _{95%})
Gênero				
Masculino	37 (72,5)	85 (76,6)	0,72	0,81 (0,36 – 1,84)
Feminino	14 (27,5)	26 (23,4)	0,72	1,24 (0,54 – 2,81)
Idade >60 anos	12 (23,5)	19 (17,1)	0,45	1,49 (0,61 – 3,61)
Diagnóstico de Admissão				
Clínico	28 (54,9)	35 (31,5)	0,007*	2,64 (1,27 – 5,54)
Cirúrgico	7 (13,7)	15 (13,5)	0,83	1,02 (0,35 – 2,91)
Trauma	16 (31,4)	61 (55,0)	0,008*	0,37 (0,17 – 0,80)
Tempo para Colonização ≥ 7 dias	27 (52,9)	28 (25,2)	0,001*	3,33 (1,57 – 7,12)
Tempo de Internação UTI ≥ 21 dias	17 (33,3)	29 (26,1)	0,44	1,41 (0,65 – 3,08)
Procedimentos Invasivos				
≥ 4	18 (35,3)	26 (23,4)	0,16	1,78 (0,81 – 3,91)
Traqueostomia	13 (25,5)	9 (8,1)	0,005*	3,88 (1,41 – 10,84)
CVC [§]	49 (96,1)	99 (89,2)	0,22	2,97 (0,59 – 20,03)
SV [§]	49 (96,1)	109 (98,2)	0,59	0,45 (0,04 – 4,63)
SNG [§]	42 (82,4)	104 (93,7)	0,04*	0,31 (0,10 – 1,00)
Dreno	11 (21,6)	21 (18,9)	0,85	1,18 (0,48 – 2,87)
Uso de Corticóides	12 (23,5)	16 (14,4)	0,22	1,83 (0,73 – 4,55)
Terapia Antibiótica Prévia	50 (98,0)	98 (88,3)	0,06	6,63 (0,86 – 139,62)
Uso de Antibióticos				
≥3	20 (39,2)	36 (32,4)	0,50	1,34 (0,64 – 2,83)
Carbapenêmicos	18 (35,3)	19 (17,1)	0,01*	2,64 (1,16 – 6,03)
Vancomicina	13 (25,5)	31 (27,9)	0,89	0,88 (0,39 – 1,99)
Cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a gerações	32 (62,7)	61 (55,0)	0,44	1,38 (0,66 – 2,88)
Penicilinas				
Ampicilina	7 (13,7)	20 (18,0)	0,64	0,72 (0,26 – 1,99)
Oxacilina	8 (15,7)	7 (6,3)	0,10	2,76 (0,84 – 9,15)
Fluorquinolonas	4 (7,8)	12 (10,8)	0,76	0,70 (0,18 – 2,52)
Outros [¶]	31 (60,8)	67 (60,4)	0,90	1,02 (0,49 – 2,12)

[§]Cateter Vascular Central, [§]Sonda Vesical, [§]Sonda Nasogástrica; [¶]Cefazolina, Clindamicina, Fluconazol, Metronidazol, Nistatina, Azitromicina, Teicoplanina, Polimixina, Azitromicina; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança. * estatisticamente significativa ($P<0,05$).

Tabela 8: Análise multivariada dos fatores de risco para colonização nasal por *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) ou sensível (MSSA) à oxacilina em pacientes internados sob ventilação mecânica na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

Fator de risco	P	OR (IC_{95%})
Diagnóstico de Admissão		
Clínico	0,44	1,54 (0,51 – 4,68)
Tempo para Colonização ≥ 7 dias	0,09	2,06 (0,89 – 4,77)
Procedimentos Invasivos		
Traqueostomia	0,01*	3,64 (1,27 – 10,42)
Uso de Antibióticos		
Carbapenêmicos	0,26	1,67 (0,68 – 4,10)

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança. *estatisticamente significante ($P \leq 0,05$)

Durante o período do estudo, as superfícies próximas ao paciente (mesa de cabeceira e grade da cama) e o ar foram monitorados microbiologicamente quanto a presença de *S. aureus*, nas proximidades de leitos ocupados por pacientes colonizados e/ou infectados por esse microrganismo. No total, 196 superfícies foram amostradas pela técnica de swab com resultados positivos para *S. aureus* de 10,7%. O fenótipo MRSA foi detectado em 28,6% dessas superfícies, frequência idêntica à observada quando da avaliação do ar. O número de pacientes infectados ou colonizados com *S. aureus* apresentou correlação positiva com a recuperação do microrganismo em superfícies ambientais (Figura 5). Adicionalmente foram coletadas (196) amostras das mãos de profissionais de saúde que faziam atendimento aos pacientes que desenvolveram infecção ou estavam colonizados por *S. aureus*. Esse microrganismo foi isolado em 8,2% das mãos destes profissionais com frequência importante do MRSA (37,5%). As frequências de *S. aureus*, MRSA e MSSA no ar, superfícies e mãos dos profissionais de saúde estão na figura 6.

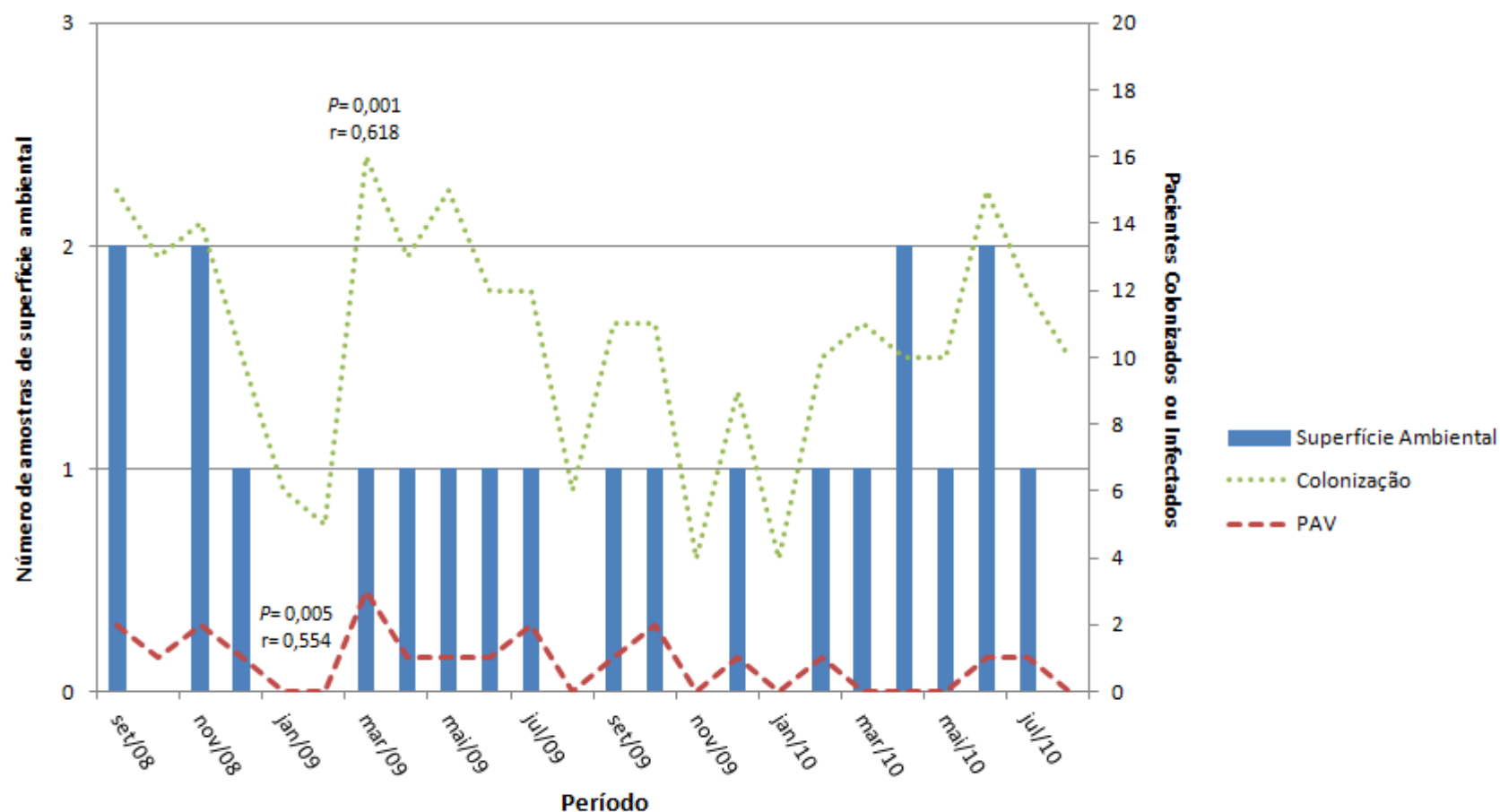


Figura 5: Correlação entre a recuperação de amostras de *Staphylococcus aureus* de superfícies ambientais com colonização ou pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados na UTI de adultos do HC-UFG, período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

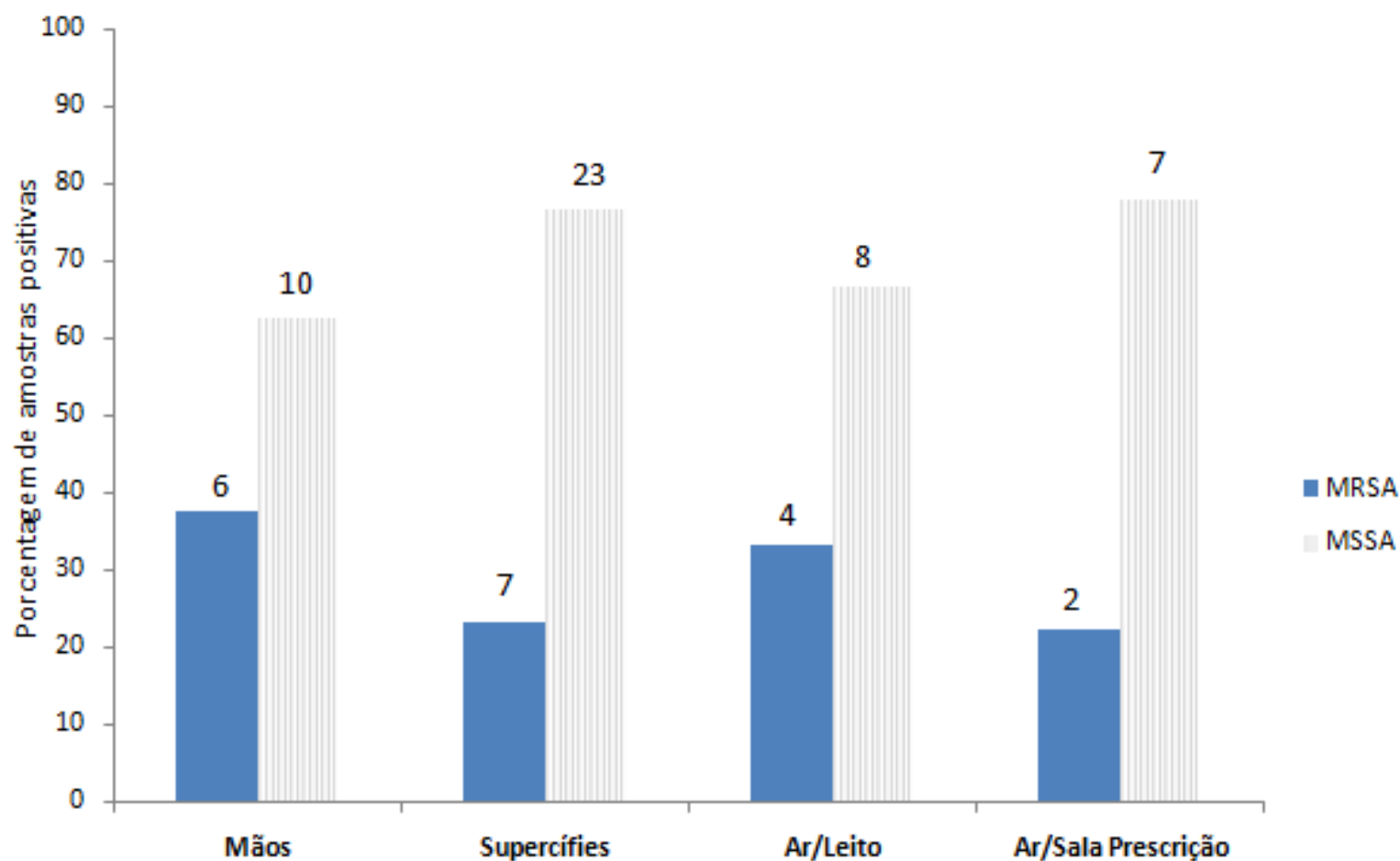


Figura 6: Presença de *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) ou resistente (MRSA) à oxacilina em superfície ambiental, ar e mãos de profissionais de saúde na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Setembro de 2008 a Agosto de 2010.

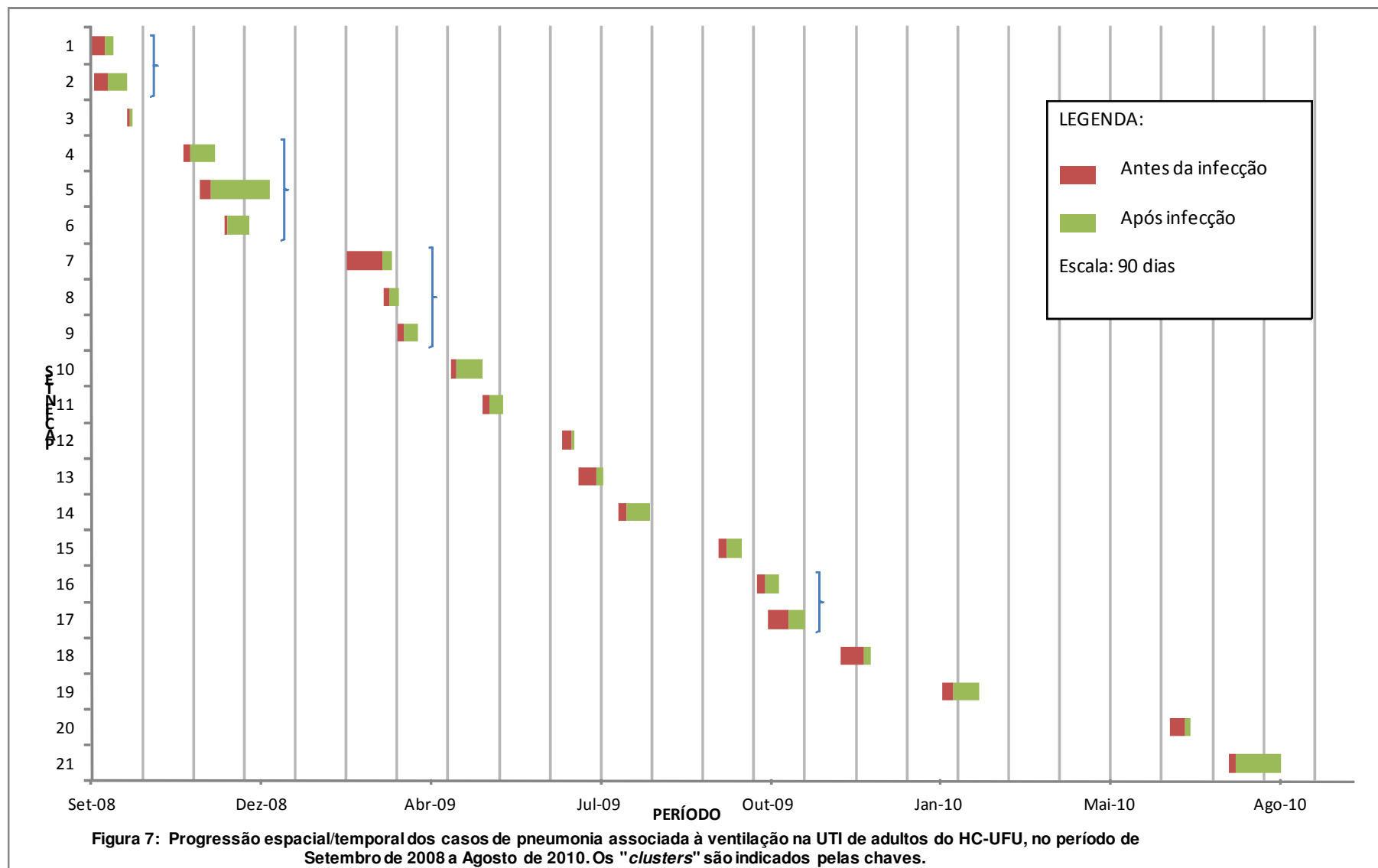
Por um período de oito meses a avaliação microbiológica de superfícies ambientais foi realizada por 2 técnicas (“swab” e “wipe-rinse”) com a finalidade de avaliar e aumentar a sensibilidade na recuperação do *S. aureus*. A técnica de “wipe-rinse” foi significativamente melhor quando comparada com a de “swab”, com positividade de 25,8% e 12,1%, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9: Recuperação de *Staphylococcus aureus* de amostras de superfície ambiental próxima a pacientes colonizados e/ou infectados pelos métodos de “swab” e “wipe-rinse” na UTI de adultos do HC-UFU, no período de Janeiro a Agosto 2010.

Ambiente	Técnica	
	Swab	“Wipe-rinse”
	N= 66 (%)	N= 66 (%)
Paciente Colonizado	7 (10,6)	15 (22,7)
Paciente Infectado	1 (1,5)	2 (3,0)
Total*	8 (12,1)	17 (25,8)

* Estatisticamente significativa (P<0,05)

Relação temporal e espacial foi verificada em cerca de metade dos pacientes infectados (47,6%) e 4 “clusters” foram detectados durante o estudo (Figura 7).



Todos os isolados de MRSA incluídos na análise molecular tiveram o gene *mecA* confirmado pela técnica PCR (Figura 8). A similaridade genética entre as amostras isoladas de aspirado traqueal, narina, ambiente (ar e superfície) e mãos de profissionais de saúde foi realizada por meio da técnica de PFGE, incluindo-se 28 isolados de *S. aureus*, sendo 11 MRSA e 17 MSSA (Figuras 8A e 9A). Os resultados obtidos geraram dendrogramas de similaridade genética apresentados nas figuras 8B e 9B. No total, foram encontrados 13 perfis genotípicos distintos de *S. aureus* diferenciados entre si por um coeficiente de similaridade acima de 95%, seis correspondendo ao MRSA (H a M) e sete ao MSSA (A a G), com um (Tipo J) e três (D a F) padrões predominantes, respectivamente. Entre as amostras de MSSA com o padrão de PFGE D e F, dois subtipos (D1 e F1) foram detectados em superfície ambiental, mucosa nasal e aspirado traqueal. Entre os isolados de MRSA, o tipo J foi evidenciado em 45,5% das amostras testadas enquanto os tipos D, E e F para MSSA foram detectados em 70,6%. O mesmo perfil clonal foi observado em isolados correspondentes ao mesmo paciente em oito oportunidades. Esses dados assim como os perfis genotípicos (A a M) das amostras analisadas estão na tabela 10.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que seis dos onze isolados de MRSA foram resistentes aos mesmos seis antibióticos (clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina e gentamicina) e sensível à rifampicina, cloranfenicol e vancomicina. Das cinco amostras com perfil genético diferente, todas foram sensíveis a rifampicina, vancomicina e tetraciclina e duas sensíveis a gentamicina.

Amostras de dois dos três pacientes que adquiriram MRSA na UTI incluídos na avaliação clonal apresentaram o mesmo perfil (J). Houve evidências sugerindo que um paciente (número 17) adquiriu MRSA do ambiente enquanto internado na UTI. Este paciente foi admitido na unidade no mesmo leito onde MRSA com perfil clonal indistinguível foi isolado de paciente infectado e colonizado. A figura 10 apresenta a cronologia do isolamento das amostras e evidências de transmissão do MRSA com este perfil clonal na UTI.

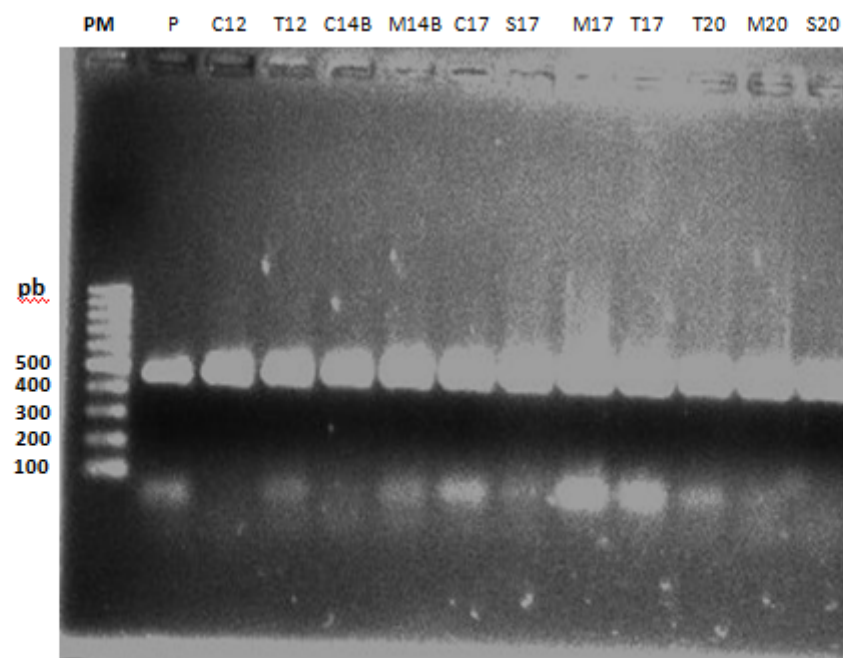


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *mecA*. Isolados com prefixo C, T, S e M foram obtidos de amostras de *Staphylococcus aureus* de colonização nasal, aspirado traqueal, superfície ambiental e mãos de profissionais de saúde, respectivamente. PM: padrão de peso molecular. P: controle positivo.

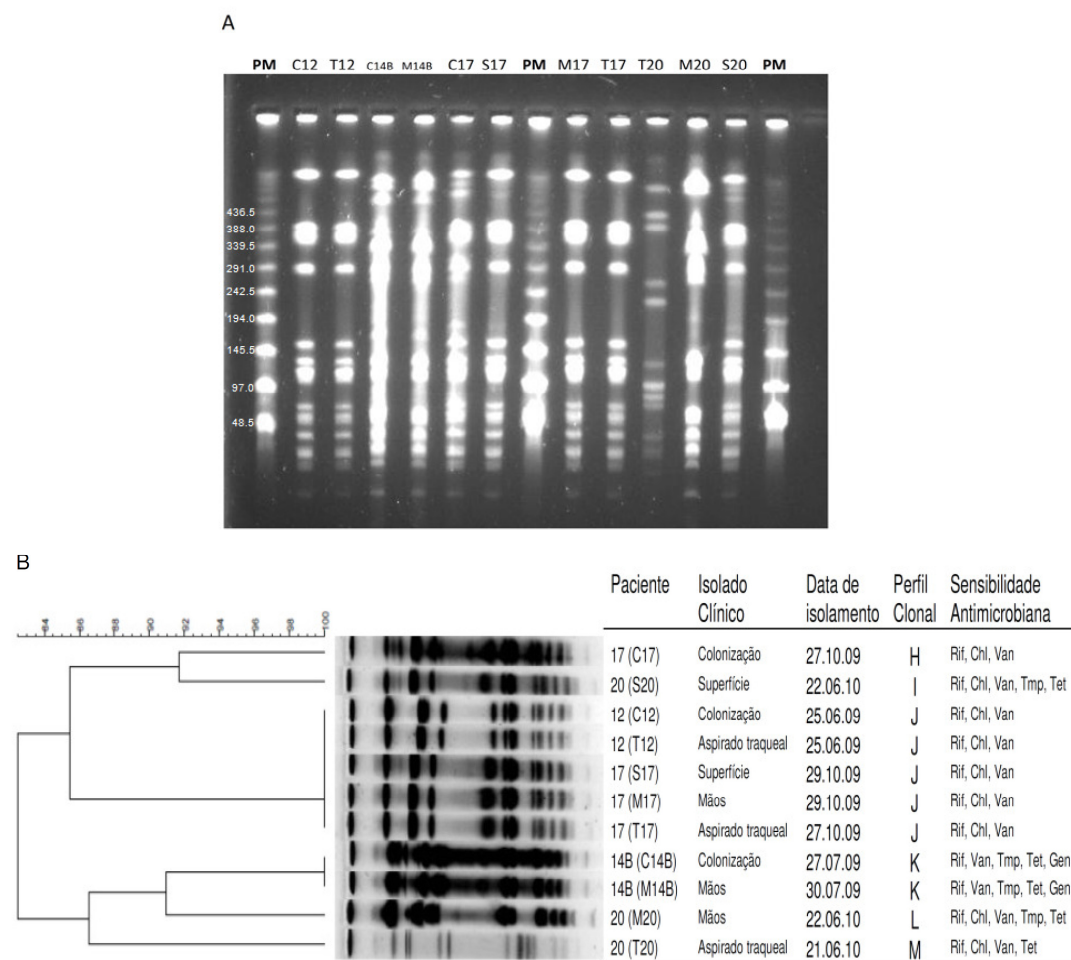


Figura 9: Perfil de macrorestrição do DNA (A) e dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA (B) de isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). Isolados com prefixo C, T, S e M foram obtidos de colonização nasal, aspirado traqueal, superfície ambiental e mãos de profissionais de saúde, respectivamente. Isolados que mostraram 95% ou mais de similaridade foram considerados do mesmo perfil clonal identificados com a mesma letra. PM: padrão de peso molecular.

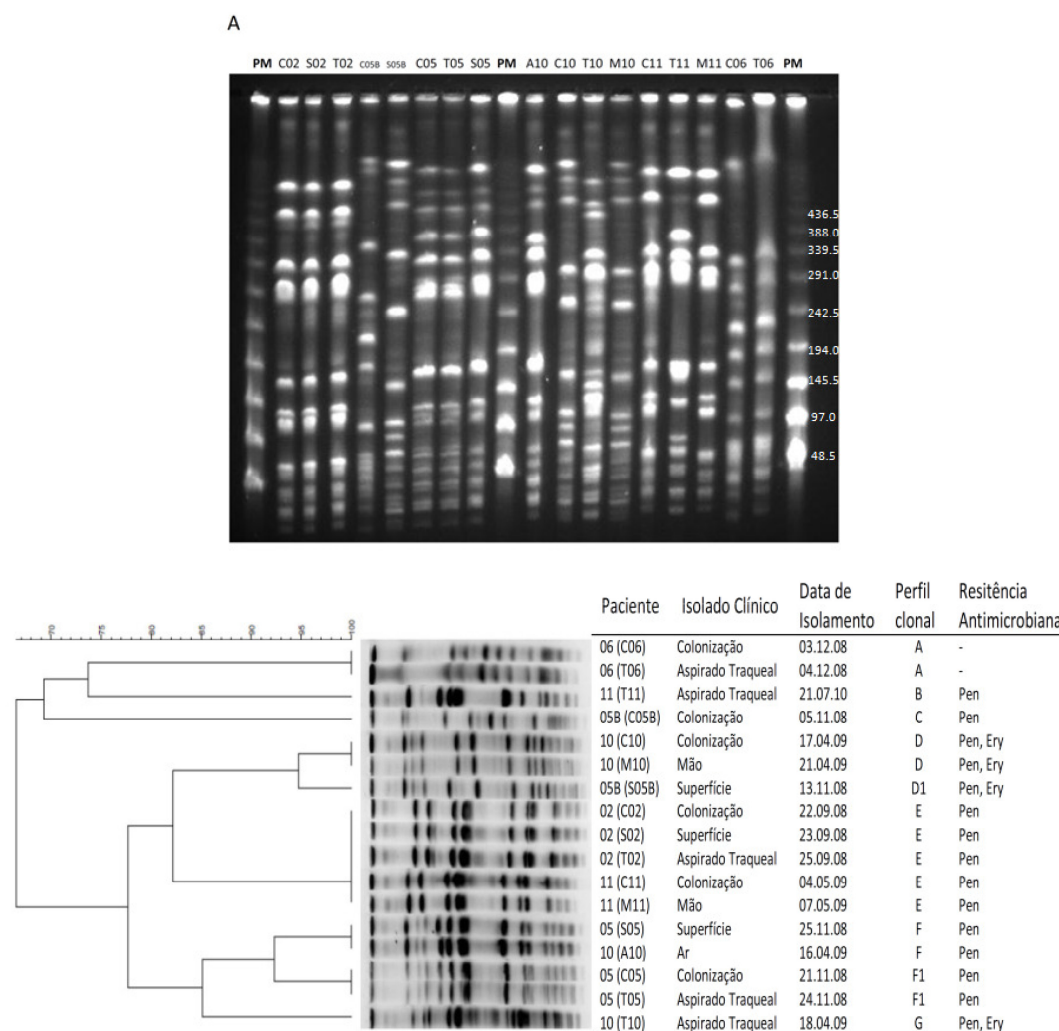


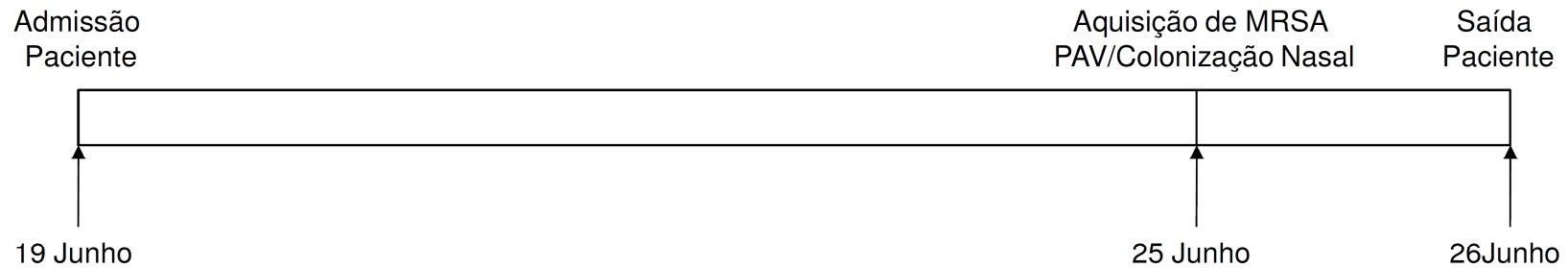
Figura 10: Perfil de macrorestrição do DNA (A) e dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA (B) de isolados de *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). Isolados com prefixo C, T, S, M e A foram obtidos de colonização nasal, aspirado traqueal, superfície ambiental, mãos de profissionais de saúde e ar, respectivamente. Isolados que mostraram 95% ou mais de similaridade foram considerados do mesmo perfil clonal identificados com a mesma letra. PM: padrão de peso molecular.

Tabela 10: Genótipos e perfis de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* da UTI de adultos do HC-UFU.

Paciente	Origem	Data de Isolamento	PFGE	Perfil de Resistência
02	Colonização	22.09.08	E	MSSA
02	Superfície	23.09.08	E	MSSA
02	Aspirado Traqueal	25.09.08	E	MSSA
05B	Colonização	05.11.08	C	MSSA
05B	Superfície	13.11.08	D1	MSSA
05	Colonização	21.11.08	F1	MSSA
05	Aspirado Traqueal	24.11.08	F1	MSSA
05	Superfície	25.11.08	F	MSSA
06	Colonização	03.12.08	A	MSSA
06	Aspirado Traqueal	04.12.08	A	MSSA
10	Ar	16.04.09	F	MSSA
10	Colonização	17.04.09	D	MSSA
10	Aspirado Traqueal	18.04.09	G	MSSA
10	Mão	21.04.09	D	MSSA
11	Colonização	25.06.09	E	MSSA
11	Mão	26.06.09	E	MSSA
11	Aspirado Traqueal	25.06.09	B	MSSA
12	Colonização	25.06.09	J	MRSA
12	Aspirado Traqueal	25.06.09	J	MRSA
14B	Colonização	27.07.09	K	MRSA
14B	Mão	30.07.09	K	MRSA
17	Colonização	27.10.09	H	MRSA
17	Aspirado Traqueal	27.10.09	J	MRSA
17	Superfície	29.10.09	J	MRSA
17	Mão	29.10.09	J	MRSA
20	Aspirado Traqueal	21.06.10	M	MRSA
20	Superfície	22.06.10	I	MRSA
20	Mão	22.06.10	L	MRSA

*PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina.

PFGE Perfil J – Paciente número 12 – Leito 07



PFGE Perfil J – Paciente número 17 – Leito 07

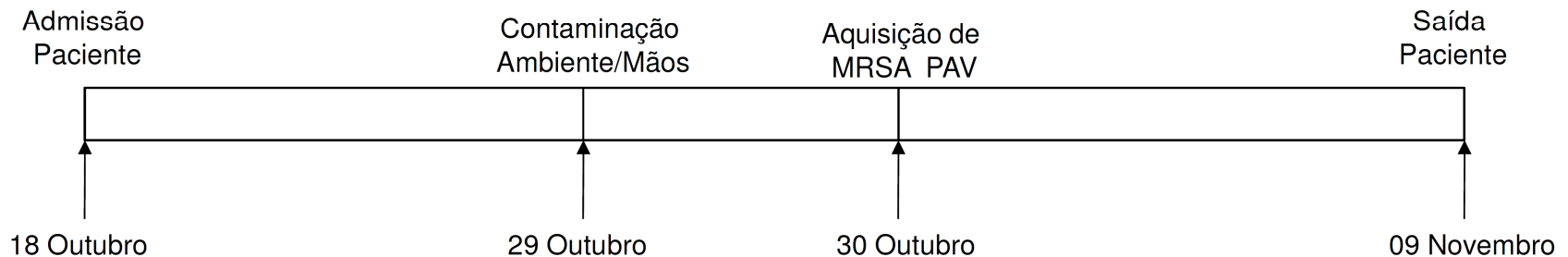


Figura 11: Evidências da transmissão de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) com perfil J na eletroforese em campo pulsado (PFGE) a partir do ambiente e mãos dos profissionais de saúde para pacientes na UTI de adultos do HC-UFU no período de Junho a Novembro de 2009. As linhas representam as datas quando o MRSA foi isolado da mucosa nasal, aspirado traqueal, superfície ambiental e mãos dos profissionais de saúde. PAV: pneumonia associada à ventilação mecânica.

5. DISCUSSÃO

As IHS são prevalentes nas UTIs e associadas com maiores taxas de morbidade, mortalidade, tempo de hospitalização e aumento nos custos, implicando em pior prognóstico para os pacientes nestas unidades (NOGUEIRA et al., 2001; BLOEMENDAAL et al., 2009). Entre as IHS a pneumonia é a infecção mais frequente tanto nas UTIs de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, com taxas de incidência elevadas, podendo atingir 25% do total de infecções, aumentando de forma significativa quando os pacientes estão sob ventilação mecânica (BONTEN et al., 2005). Entretanto, estas taxas variam significativamente considerando a população estudada e os critérios de diagnóstico utilizados (TEIXEIRA et al., 2004).

O diagnóstico de pneumonia hospitalar é difícil, exigindo a utilização de critérios clínicos, radiológicos, laboratoriais e microbiológicos (XIE et al., 2011). Os dados clínicos apresentam baixa especificidade, mas em função da gravidade são usualmente utilizados para o início de terapia antibiótica empírica de amplo espectro (NIEDERMAN, 2005). Os métodos diagnósticos microbiológicos quantitativos são mais específicos e incluem: lavado broncoalveolar com e sem broncoscopia (minibal) e o escovado protegido. Adicionalmente, há o aspirado traqueal como uma alternativa, de custo mais baixo, com boa sensibilidade, mas especificidade questionada. No entanto, a utilização de um ponto de corte de 10^6 UFU/mL para definição de positividade melhora a sua especificidade quando comparada a de técnicas invasivas (DAVIS, 2006).

A taxa de incidência de pneumonia varia de 9% a 68% nos pacientes ventilados (CAMARGO et al., 2004; GUIMARÃES; ROCCO, 2006) e está intimamente relacionada ao tempo de ventilação mecânica, com um risco mais alto nos primeiros dias de uso do dispositivo (DAVIS, 2006). Rocha e colaboradores demonstraram que a ocorrência de PAV é comum na UTI de adultos do HC-UFU com taxa de incidência de 30,5% e associada a pior prognóstico, com mortalidade hospitalar de 32,1%. Estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, mostrou uma incidência de PAV de 48,1% (RODRIGUES et al., 2009) e no presente estudo esta

taxa foi de 35,4%. Estudos desenvolvidos na UTI de adultos do HC-UFU evidenciam a importância desta síndrome infecciosa para a realidade local.

Os microrganismos causadores de PAVs variam de acordo com as características da unidade, política de uso de antibióticos, padrões de resistência aos antimicrobianos, tempo de internação e uso de ventilação mecânica (HUNTER, 2006). Apesar de *P. aeruginosa* ser um patógeno muito frequente como causa desta infecção em UTIs nos hospitais brasileiros, correspondendo aproximadamente um terço dos agentes isolados, o *S. aureus* continua a figurar entre os três microrganismos mais frequentes (GUIMARÃES; ROCCO, 2006). Estudos recentes realizados no HC-UFU relataram o *S. aureus* como o segundo principal agente causador desta infecção (MOREIRA, 2008). No presente estudo, a frequência de PAV por *S. aureus* foi baixa (12,5%), taxa inferior quando comparada a de outros hospitais (CAMARGO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004; ROCHA et al., 2008), mas há evidências que esta situação pode mudar, considerando que a epidemiologia desta infecção, é complexa, multifatorial e relacionada, sobretudo ao uso de antibióticos, políticas de prevenção e controle de IHS e maior ou menor susceptibilidade dos pacientes (WOODFORD; LIVERMORE, 2009).

O principal reservatório de *S. aureus* é o paciente infectado e/ou colonizado, com o portador deste microrganismo na mucosa nasal representando fator de risco para o desenvolvimento de infecções tais como de sítio cirúrgico, corrente sanguínea e pneumonia, principalmente em pacientes admitidos na UTI (BURIAN et al., 2010). Na nossa investigação a pesquisa de colonização nasal por *S. aureus* foi realizada em 873 pacientes, verificando-se uma frequência alta (26,7%), semelhante à observada por outros pesquisadores em estudos prévios realizados no mesmo hospital (SADOYAMA; GONTIJO FILHO, 2000). Adicionalmente, ficou evidente relação positiva de pacientes colonizados por este microrganismo e aqueles que desenvolveram PAV. Recomendações do CDC incluem a vigilância ativa de pacientes colonizados como medida de controle, particularmente entre pacientes de risco internados em UTI (MARTINEZ-CAPOLINO et al., 2010). Esses dados ressaltam a importância desse microrganismo em unidades críticas com a valorização deste fator de risco associado com a infecção.

Entre os fatores de risco para colonização por MRSA no hospital estão incluídos: idade avançada, hospitalização prévia, tempo de internação no hospital e em UTIs, doenças crônicas, exposição a pacientes colonizados ou infectados, uso

de procedimentos invasivos e de antibióticos (KORN et al., 2001). No nosso estudo, os fatores de risco para colonização por MRSA observados quando da análise univariada foram: diagnóstico clínico de admissão, tempo para a colonização igual ou superior a sete dias, uso de traqueostomia e de carbapenêmicos, permanecendo independentemente associado quando da análise multivariada apenas o uso de traqueostomia.

Em países como o Brasil alguns problemas são comuns em hospitais gerais, como o controle deficiente no uso de antimicrobianos e falta de laboratórios de microbiologia, fatores que contribuem para uma maior resistência e multiresistência aos antimicrobianos nestas instituições (ROSSI, 2011). A exemplo do que está sendo observado internacionalmente, cerca da metade das infecções causadas por *S. aureus* nos hospitais brasileiros está associada ao MRSA (FORTALEZA et al., 2009). No nosso estudo, entretanto, o MRSA correspondeu somente a 19,0% e 31,5% dos isolados de infecção e colonização, respectivamente.

As IHS causadas por microrganismos resistentes decorrem usualmente da transmissão cruzada através das mãos de profissionais de saúde (PITTET et al., 1999) o que foi observado neste estudo no que se refere à presença do MRSA. Os profissionais de saúde são apontados como disseminadores destes microrganismos, incluindo *S. aureus* no ambiente hospitalar, sobretudo aqueles que têm mais contato com os pacientes como profissionais de enfermagem, seja pela contaminação direta quando do cuidado do paciente ou por tocar superfícies que estão contaminadas por microrganismos associados as IHS (HARDY et al., 2006; DANCER et al., 2008; WILLIAMS et al., 2009). Os nossos resultados apontaram a presença do *S. aureus* em 8,2% das mãos dos profissionais, com uma frequência de 37,5% de MRSA.

Evidências sugerem que cerca de 30% dos casos de infecção são preveníveis por medidas simples como a higiene das mãos (HARBARTH et al., 2003), entretanto, esta técnica é difícil de ser implementada em decorrência de aspectos que incluem: falta de informação, excesso de trabalho/atividades do profissional de saúde, inexistência ou dificuldade de acesso às pias, sabão, toalha e soluções alcoólicas, custos e aceitabilidade da formulação em função de seus efeitos adversos (BOYCE; PITTET, 2002; HILBURN et al., 2003; LARSON et al., 2006; ROCHA et al., 2007). Um estudo recente realizado no HC-UFU demonstrou a dificuldade dos profissionais quanto a este procedimento evidenciando uma adesão

ainda mais baixa do que a relatada na literatura (cerca de 40%) quanto à higiene das mãos (ROCHA et al., 2009; BORGES, 2009).

Há evidências de que o ambiente representa um papel significativo na epidemiologia de alguns microrganismos de importância hospitalar como *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* (MEMARZADEH et al., 2010) e MRSA, que são capazes de sobreviver em condições adversas de pouca umidade e persistir por longos períodos em áreas clínicas inadequadamente limpas (DANCER et al., 2008; GEHANNO et al., 2009). Nas UTIs, as superfícies contaminadas próximas ao paciente podem contaminar as mãos dos profissionais de saúde quando tocadas (HARDY et al., 2006).

A presença de *S. aureus* no ar tem sido também verificada e sua transmissão pode ser favorecida pela presença de portadores nasais e pacientes com infecção do trato respiratório (GEHANNO et al., 2009). No nosso estudo, a contaminação do ambiente (superfície e ar) com *S. aureus* foi detectada próxima a leitos ocupados por pacientes infectados ou colonizados, indicativo do seu risco potencial como reservatório secundário deste microrganismo no hospital.

Considerando que a limpeza do ambiente hospitalar representa importante estratégia de prevenção da transmissão nosocomial de microrganismos (CARVALHO et al., 2007), a amostragem microbiológica do ambiente hospitalar é útil para avaliar a efetividade das técnicas usadas rotineiramente, assim como para incentivar novos procedimentos de limpeza e desinfecção (EWIG et al., 1999; MACLEAN et al., 2010). Culturas de superfícies utilizando swab têm sido amplamente utilizadas em estudos clínicos para analisar o ambiente e investigações relatam que após a limpeza, 82% de superfícies avaliadas como visualmente limpas, somente 30% foram consideradas limpas usando métodos microbiológicos (GRIFFITH et al., 2000).

A redução dos casos de infecção nosocomial é complexa e dependente de vários fatores (AL-HAMAD; MAXWELL, 2008) sendo que as recomendações para controle destas infecções incentivam a limpeza e desinfecção de áreas ocupadas por pacientes infectados e/ou colonizados (OBEE et al., 2007). Apesar disso, os procedimentos de limpeza de superfícies hospitalares frequentemente são pobres e inefetivos e estudos têm evidenciado a necessidade de maiores esforços quanto à melhora destas técnicas para prevenção e controle de infecções (AL-HAMAD; MAXWELL, 2008).

Em um período curto de observação, foi possível isolar amostras de *S. aureus* sensíveis e resistentes à oxacilina a partir de diferentes fontes: mucosa nasal, aspirado traqueal, mãos de profissionais de saúde e de ambiente (superfície e ar), corroborando as observações feitas anteriormente. Nos estudos epidemiológicos, a discriminação dos isolados é passível de ser realizada por técnicas fenotípicas clássicas, como por exemplo, utilizando o perfil de resistência aos antibióticos (GEHANNO et al., 2009), porém, a adoção de métodos moleculares permite uma melhor discriminação (HARRIS et al., 2010). Em relação ao *S. aureus*, a técnica de “DNA fingerprint”, com destaque para o PFGE, é considerada pela literatura internacional o padrão ouro pelo seu alto poder discriminatório na identificação das amostras, contribuindo para delinear melhores medidas de prevenção e controle do microrganismo nos hospitais (TENOVER et al., 1997).

A análise da clonalidade das amostras de *S. aureus*, MRSA e MSSA isoladas neste trabalho, realizada pela técnica de PFGE revelou grande diversidade de genótipos. Em estudo recente sobre a epidemiologia deste microrganismo no ambiente hospitalar foi relatada situação semelhante (SCHUENCK et al., 2009). Há suspeitas de que a ampla variedade de genótipos desse microrganismo encontradas no nosso estudo e o isolamento de mais de uma linhagem em um mesmo paciente pode ocorrer facilmente pela disseminação através do ambiente e das mãos dos profissionais de saúde, considerando sua permanência por longo tempo na unidade. Por outro lado, foi evidenciado com o exemplo dos pacientes 2 e 11, os quais encontravam-se colonizados com genótipos idênticos situação onde pode ter ocorrido aquisição a partir de fonte comum ou ocorrência de transmissão cruzada.

A importância da colonização tanto como fator de risco para infecção quanto como reservatório no ambiente hospitalar é bem conhecida e não deve, portanto ser negligenciada (BABU et al., 2009; CHEN et al., 2010; HARINSTEIN et al., 2011). Neste estudo verificou-se o mesmo perfil clonal em amostras de colonização e posteriormente de infecção do mesmo paciente como observado nos pacientes 2 e 5.

A diversidade de genótipos das amostras de *S. aureus*, tanto de MRSA quanto MSSA em UTI, pode ser indicativo não só da transmissão pelas mãos e da eliminação através de aerossóis provenientes do trato respiratório dos pacientes internados, mas também de problemas resultantes de deficiência na limpeza e desinfecção na unidade. Adicionalmente, não pode ser esquecida a pressão

seletiva, em se tratando de amostras de MRSA, da utilização de antimicrobianos em quantidade acima da observada em hospitais no hemisfério norte (ROSSI, 2011). Desta forma, as medidas de prevenção e controle de IHS na unidade deixam a desejar, sobretudo em aspectos básicos como higiene das mãos e limpeza e desinfecção de superfícies havendo necessidade de maior supervisão e monitoramento.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou que seis de onze isolados de MRSA foram resistentes simultaneamente a seis antibióticos (clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e gentamicina) e sensíveis a rifampicina, cloranfenicol e vancomicina. Dos cinco isolados com diferentes perfis clonais, todos foram sensíveis a rifampicina, vancomicina e tetraciclina e dois foram sensíveis à gentamicina. A presença de multiresistência é característica de amostras nosocomiais de MRSA (ROSSI, 2011), embora possam ocorrer em ambientes extra-hospitalares, e a prevalência de um único perfil com o mesmo padrão de resistência aos antibióticos foi detectada não só nos hospitais do país (SCHUENCK et al., 2009), mas em outras regiões geográficas, e está relacionada à transmissão horizontal, sobretudo por meio das mãos de profissionais de saúde e favorecida pela pressão seletiva da utilização de antibióticos (LIN et al., 2007).

Com base em estudos clássicos sobre a relação genética entre as amostras de *S. aureus*, nossos dados sugerem que entre os isolados de MRSA o clone J provavelmente está relacionado ao clone endêmico brasileiro que já foi comprovado estar presente e disseminado no HC-UFU. Os perfis clonais considerados como não relacionados detectados na nossa investigação no ano de 2008 principalmente aqueles associados ao fenótipo MSSA não foram mais recuperados em 2009 ao contrário do observado para os perfis relacionados, refletindo uma boa adaptação destes últimos na nossa unidade.

Analisando cronologicamente as amostras de MRSA dos pacientes 12 e 17, aquela proveniente de um episódio de PAV no paciente 12 foi isolada cerca de três meses antes das amostras com um perfil de restrição idêntico ao encontrado nas mãos de profissionais de saúde, superfície ambiental e PAV relacionada ao paciente 17, evidenciando a longa permanência deste clone no ambiente e a sua transmissão através das mãos de profissionais de saúde. Desta forma, o presente estudo mostrou a importância das técnicas de tipagem molecular na análise de amostras de

S. aureus, revelando perfis moleculares idênticos em períodos de tempo diferentes sugerindo a transmissão microbiana entre pacientes na UTI.

6. CONCLUSÕES

A mucosa nasal de pacientes adultos críticos apresentou-se colonizada por *S. aureus*, predominantemente por amostras sensíveis à oxacilina, que se apresentou como risco significativo pela análise univariada para o desenvolvimento posterior para PAV, independente se sensível ou resistente a este antibiótico. A colonização por MRSA foi associada independentemente com traqueostomia quando comparada com o grupo com MSSA. A taxa de incidência por PAVs por *S. aureus* foi baixa quando comparada a de bacilos gram-negativos, com predomínio de casos por MSSA.

A presença do *S. aureus* na unidade caracterizou-se pela policlonalidade, com evidências diretas de contaminação do ambiente, de transmissão cruzada e da relação entre pneumonia e colonização prévia da mucosa nasal do paciente por esse microrganismo. A participação da superfície como reservatório potencial para infecção na cadeia epidemiológica foi evidenciada com clones idênticos de MRSA isolados de paciente, superfície, mão de profissional de saúde e posteriormente, após transcurso de aproximadamente três meses, de um segundo paciente com PAV, ocupando o mesmo leito. Em síntese, mesmo em condições endêmicas foi documentada, reforçando a importância da utilização de práticas de limpeza e desinfecção adequadas, sobretudo em UTIs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HAMAD, A.; MAXWELL, S. How clean is clean? Proposed methods for hospital cleaning assessment. **Journal of Hospital Infection**, v.70, n. 4, p. 328-34, Dec., 2008.

ALP, E.; GUVEN, M.; YILDIZ, O.; AYGEN, B.; VOSS, A.; DOGANAY, M. Incidence, risk factors and mortality of nosocomial pneumonia in Intensive Care Units. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 17, p. 1-7, Sep., 2004.

ALP, E.; VOSS, A. Ventilator associated pneumonia and infection control. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n.7, p. 1-11, Apr., 2006.

BABU, T.; REKASIUS, V.; PARADA, J. P.; SCHRECKENBERGER, P.; CHALLAPALLI, M. Mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-colonized patients at admission to a tertiary care medical center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2279-80, Jul., 2009.

BLOEMANDAAL, A. L. A.; FLUIT, C.; JANSEN, W. M. T.; VRIENS, M. R.; FERRY, T.; ARGAUD, L.; AMORIM, J. M.; RESENDE, A. C.; PASCUAL, A.; LÓPEZ-CERERO, L.; STEFANI, S.; CASTIGLIONE, G.; EVANGELOPOULOU, P.; TSIPLAKOU, S.; RINKES, I. H. M. B.; VERHOEF, J. Acquisition and cross-transmission of *Staphylococcus aureus* in European intensive care units. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 2, p. 117-24, Feb., 2009.

BONTEN, M. J.; CASTRE, J.; CRAIG, W. A.; FAGON, J.; HALL, J.; JACOBY, G. A.; KOLLEF, M. H.; LUNA, C. M.; MANDELL, L. A.; TORRES, A.; WUNDERINK, R. G. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 4, p. 388-416, Feb., 2005.

BOUZA, E.; GIANNELLA, M.; BUNSOW, E.; TORRES, M. V.; GRANDA, M. J. P.; MARTIN-RABADÁN, P.; MUÑOZ, P. Ventilator-associated pneumonia due to meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk factors and outcome in a large general hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 2, p. 150-55, Feb., 2012.

BORGES, L. F. A. Higiene das mãos de profissionais de saúde em um hospital brasileiro: adesão, controle de infecção e transmissão de *Staphylococcus aureus*. 2009. Tese de Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 67.

BOYCE, J. M. Antiseptic technology, access, affordability and acceptance. **Emerging Infection Diseases**, v. 7, n. 2, p. 231-33, Mar./Apr., 2001.

BOYCE, J.M.; PITTET, D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/ SHEA / APIC/ IDSA Hand Hygiene Task Force. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.51, RR-16, 2002.

BURIAN, M.; WOLZ, C.; GOERKE, C. Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. 1-9, Apr., 2010.

CAMARGO, L. F. A.; DE MARCO, F. V.; BARBAS, C. S. V.; HOELZ, C.; BUENO, M. A. S.; RODRIGUES JUNIOR, M.; AMADO, V. M.; CASERTA, R.; MARTINO, M. D. V.; PASTERNAK, J.; KNOBEL, E. Ventilator associated pneumonia: comparison between quantitative and qualitative cultures of tracheal aspirates. **Critical Care**, v. 8, n. 6, p. 422-30, Oct., 2004.

CARDOSO, R. L. Pneumonia em pacientes sob ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina internados em UTI de adultos: aspectos microbiológicos, clínicos e epidemiológicos. 2007. Dissertação de Mestrado em Genética e Bioquímica – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 42.

CARRILHO, C. M. D. M. Fatores associados ao risco de desenvolvimento de pneumonia hospitalar na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Regional do Norte de Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 455-56, Jul/Ago., 1999.

CARVALHO, K. S.; MELO, M. C.; MELO, G. B.; GONTIJO FILHO, P. P. Hospital surface contamination in wards occupied by patients infected with MRSA or MSSA in a Brazilian university hospital. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 159-63, 2007.

CARVALHO R.H. Bactérias resistentes e multirresistentes a antibióticos nos pacientes internados em uma UTI de adultos de hospital universitário brasileiro. UFU, 2007. 38p. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

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

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R.; Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n.9, p. 629-41, Sep., 2009.

CHASTRE, J. Conference Sumary: Ventilator-associated Pneumonia. **Respiratory Care**, v. 50, n. 7, p. 975-83, Jul., 2005.

CHEN, C. B.; CHANG, H. C.; HUANG, Y. C. Nasal meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among intensive care unit hospitalized adult patients in a Taiwanese medical centre: one time-point prevalence, molecular characteristics and risk factors for carriage. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 2, p. 238-44, Mar., 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S18, 2009.

CREAMER, E.; DORRIAN, S.; DOLAN, A.; SHERLOCK, O.; FITZGERALD-HUGHES, D.; THOMAS, T.; WALSH, J.; SHORE, A.; SULLIVAN, D.; KINNEVEY, P.; ROSSNEY, A. S.; CUNNEY, R.; COLEMAN, D.; HUMPHREYS, H. When are the hands of healthcare workers positive for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*? **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 2, p. 107-11, Jun., 2010.

DANCER, S. J.; WHITE, L.; ROBERTSON, C. Monitoring environmental cleanliness on two surgical wards. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 18, n. 5, p. 357-64, Oct., 2008.

DATTA, R.; HUANG, S. S. Risk of infection and death due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term carriers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. 176-81, Jul., 2008.

DAVIS, K. A. Ventilator-associated pneumonia: a review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 21, n. 4, p. 211-26, Jul/Aug., 2006.

DRYDEN, M. S.; DAILLY, S.; CROUCH, M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 4, p. 283-86, Apr., 2004.

DURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 747-63, Dec., 2008.

EWIG, S.; TORRES, A.; EL-EBIARY, M.; FÁBREGAS, N.; HERNANDEZ, C.; GONZÁLEZ, J. et al. Bacterial colonization patterns in mechanically ventilated patients with traumatic and medical head injury. Incidence, risk factors, and association with ventilator-associated pneumonia. **American Journal of Critical Care Medicine**, v. 159, n. 1, p. 188-98, Jan., 1999.

FERREIRA, A. M.; ANDRADE, D. Avaliação microbiológica de luvas de procedimento: considerações para seu uso na técnica de curativo. **Revista de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 191-97, Abr./Jun., 2010.

FLORÉ, K.; VAN DEN ABEELE, A. M.; VERSCHRAEGEN, G. Speed of molecular detection techniques for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* admission screening in an acute care hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 2, p. 103-06, Jun., 2010.

FORTALEZA, C. R.; MELO, E. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Nasopharyngeal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and mortality among patients in an intensive care unit. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 17, n. 5, p. 677-82, Sep./Oct., 2009.

GAGNÉ, D.; BÉDARD, G.; MAZIADÉ, P. J. Systematic patients' hand disinfection: impact on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection rates in a community hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 4, p. 269-72, Aug., 2010.

GARCIN, F.; LEONE, M.; ANTONINI, F.; CHARVET, A.; ALBANÈSE, J.; MARTIN, C. Non-adherence to guidelines: an avoidable cause of failure of empirical antimicrobial therapy in the presence of difficult-to-treat bacteria. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 75-82, Jan., 2010.

GEHANNO, J. F.; LOUVEL, A.; NOUVELLON, M.; CAILLARD, J. PESTEL-CARON, M. Aerial dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital rooms by infected or colonized patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 3, p. 256-62, Mar., 2009.

GUIMARÃES, M. M. Q.; ROCCO, J. R. Prevalence of ventilator-associated pneumonia in a university hospital and prognosis for the patients affected. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 4. p. 339-46, Jul/Aug., 2006.

GRIFFITH, C. J.; COOPER, R. A.; GILMORE, J.; DAVIES, C.; LEWIS, M. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. **Journal of Hospital Infection**, v. 45, n. 1, p. 19-28, May, 2000.

GRUNDMANN, H.; BARWOLFF, S.; TAMI, A.; BEHNKE, M.; SCHWAB, F.; GEFFERS, C.; HALLE, E.; GOBEL, U. B.; SCHILLER, R.; JONAS, D.; KLARE, I.; WEIST, K.; WITTE, W.; BECK-BEILECKE, K.; SCHUMACHER, M.; RUDEN, H.; GASTMEIER, P. How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 5, p. 946-51, May, 2005.

HARBARTH, S.; SAX, H.; GASTMEIER, P. The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, n. 4, p. 258-66, Aug., 2003.

HARDY, K. J.; OPPENHEIM, B. A.; GOSSAIN, S.; GAO, F.; HAWKEY, P. M. A Study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients' acquisition of MRSA. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 2, p. 127-32, Feb., 2006.

HARINSTEIN, L.; SCHAFER, J.; D'AMICO, F. Risk factors associated with the conversion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation to healthcare-associated infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, n. 3, p. 194-97, Nov., 2011.

HARRIS, S. R.; FEIL, E. J.; HOLDEN, M. T. G.; QUAIL, M. A.; NICKERSON, E. K.; CHANTRATITA, N.; GARDETE, S.; TAVARES, A.; DAY, N.; LINDSAY, J. A.; EDGEWORTH, J. D.; LENCASTRE, H.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; BENTLEY, S. D. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 469-74, Jan., 2010.

HEDIN, G.; RYNBACK, J.; LORÉ, B. Reduction of bacterial surface contamination in the hospital environment by application of a new product with persistent effect. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 2, p. 112-15, Jun., 2010.

HILBURN, J.; HAMMOND, B. S.; FENDLER, E.; GROZIAK, P. A. Use of alcohol hand sanitizer as an infection control strategy in an acute care facility. **American Journal of Infection Control**, v.31, n.2, p.109-16, Apr., 2003.

HOTA, B. Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 8, p. 1182-89, Oct., 2004.

HUNTER, J. D. Ventilator associated pneumonia. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 965, p. 172-78, Mar., 2006.

IBRAHEM, S.; SALMENLINNA, S.; VIROLAINEN, A.; KERTULLA, A.; LYYTIKAINEN, O.; JAGERROOS, H.; BROAS, M.; VUOPIO-VARKILA, J. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococci* and their SCCmec types in a long-term-care facility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 32-37, Jan., 2009.

JARVIS, W. R.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; HUGUES, J. M.; HORAN, T.; EMOR, T. G.; BANERJEE, S.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; GAYNES, R. P. Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. **American Journal of Medicine**, v. 91, suppl. 3b, p. 185-91, Sep., 1991.

KARABEY, S.; AY, P.; DERBENTLI, S.; NAKIPOGLU, Y.; ESEN, F. Handwashing frequencies in an intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 1, p. 36-41, Jan., 2002.

KASSEM, I. I.; ESSEILI, M. A.; SIGLER, V. Detection and differentiation of staphylococcal contamination of clinical surfaces using denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 3, p. 187-93, Jul., 2011.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 505-20, Jul., 1997.

KOLLEF, M. H. What is Ventilator-associated Pneumonia and why is it important? **Respiratory Care**, v. 50, n. 6, p. 714-21, Jun., 2005.

KONEMAN, E. W. ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHECKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. **Diagnosis Microbiology**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

KORN, G. P.; MARTINO, M. D. V.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. J.; CHIAVONE, P. A.; MUSOLINO, L. R. S. High frequency of colonization and absence de identifiable risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intensive care units in Brazil. **The Brazillian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-7, Feb., 2001.

KOTILAINEN, P.; ROUTAMAA, M.; PELTONEN, R.; OKSI, J.; RINTALA, E.; MEURMAN, O.; LEHTONEN, O.; EEROLA, E.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; ROSSI, T. Elimination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a university hospital and district institutions, Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 169-75, Feb., 2003.

KURUP, A.; CHLEBICKA, N.; TAN, K. Y.; CHEN, E. X.; OON, L.; LING, T. A.; LING, M. L.; HONG, J. L. G. Active surveillance testing and decontamination strategies in intensive care units to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.

American Journal of Infection Control, v. 38, n. 5, p. 361-67, Jun., 2010.

LAMERS, R. P.; STINNETT, J. W.; MUTHUKRISHNAN, G.; PARKINSON, C. L.; COLE, A. M. Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. 1-12, Jan, 2011.

LARSON, E.; GIRARD, R.; PESSOA-SILVA, C. L.; BOYCE, J.; DONALDSON, L.; PITTET, D. Skin reactions related to hand hygiene and selection of hand hygiene products. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. 627-35, Dec., 2006.

LEMMEN, S. W.; HAFNER, H.; ZOLLDANN, D.; STANZEL, S.; LUTTICKEN, R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 3, p. 191-97, Mar., 2004.

LESKI, T. A.; GNIADKOWSKI, M.; SKOCZYNSKA, A.; STEFANIUK, E.; TRZCINSKI, K.; HRYNIEWICZ, W. Outbreak of Mupirocin-Resistant *Staphylococci* in a Hospital in Warsaw, Poland, Due to Plasmid Transmission and Clonal Spread of Several Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2781-88, Sep., 1999.

LIBERT, M.; ELKHOLTI, M.; MASSAUT, J.; KARMALI, R.; MASCART, G.; CHERIFI, S. Risk factors for meticillin resistance and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in a Belgian university hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, n. 1, p. 17-24, Jan., 2008.

LIN, Y.; LAUDERDALE, T.; LIN, H.; CHEN, P.; CHENG, M.; HSIEH, K.; LIU, Y. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in patients of a pediatric intensive care unit and high carriage rate among health care workers. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, n. 4, p. 325-34, Aug., 2007.

LIVERSLY, M.A.; TEBBS, S.E.; MOSS, M.A.; FAROUQUI, M.H.; LAMBERT, P.A.; ELLIOT, T.S. Use of pulsed field eletrophoresis to determine the source of microbial contamination of central venous catheter. **European Journal of Clinical Infection Diseases**, v. 17, n. 2, p. 108-12, Feb., 1998.

MACLEAN, M.; MAcGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G.; WOOLSEY, G. A.; COIA, J. E.; HAMILTON, K.; TAGGART, I.; WATSON, S. B.; THAKKER, B.; GETTINBY, G. Environmental decontamination of a hospital isolation room using high-intensity narrow-spectrum light. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 3, p. 247-51, Nov., 2010.

MARTINEZ-CAPOLINO, C.; REYES, K.; JOHNSON, L.; SULLIVAN, J.; SAMUEL, L.; DIGIOVINE, B.; EICHENHORN, M.; HORST, H. M.; VARELAS, P.; MICKEY, M. A.; WASHBURN, R.; ZERVOS, M. Impact of active surveillance on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and hospital resource utilization. **Journal of Hospital Infection**, v.74, n. 3, p. 232-37, Mar., 2010.

McARDLE, F. I.; LEE, R. J.; GIBB, A. P.; WALSH, T. S. How much time is needed for hand hygiene in intensive care? A prospective trained observer study of rates of contact between healthcare workers and intensive care patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, n. 3, p. 304-10, Mar., 2006.

MEARS, A.; WHITE, A.; COOKSON, B.; DEVINE, M.; SEDGWICK, J.; PHILLIPS, E.; JENKINSON, H.; BARDSLEY, M. Healthcare-associated infection in acute hospitals: which interventions are effective? **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 4, p. 307-13, Apr., 2009.

MEMARZADEH, F.; OLMSTED, R. N.; BARTLEY, J. M. Applications of ultraviolet germicidal irradiation disinfection in health care facilities: Effective adjunct, but not stand-alone technology. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 5, S13-24, Jun., 2010.

MOREIRA, M. R. Consumo de antibióticos, fatores de risco e evolução de pneumonia associada à ventilação por *Staphylococcus aureus* sensível ou resistente à oxacilina em pacientes internados na unidade de terapia intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro. 2008. Dissertação de mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 51.

MOREIRA, M. R.; CARDOSO, R. L.; ALMEIDA, A. B.; GONTIJO FILHO, P. P. Risk Factors and Evolution of Ventilator-Associated Pneumonia by *Staphylococcus aureus* Sensitive or Resistant to Oxacillin in Patients at the Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 499-503, Dec., 2008.

MOREIRA, M. R.; RIBAS, R. M.; RODRIGUES, A. A. A.; GONTIJO FILHO, P. P. Antibiotic consumption and etiology of ventilator-associated pneumonia in patients interned in the Intensive Care Unit of Uberlândia Federal University Hospital Clinic. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 11, n. 1, p. 11-16, Fev./Mar., 2009.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNISS). System report, data summary from January 1992 – June 2001. **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 6, p. 404-21, Dec., 2001.

NERANDIZIC, M. M.; CADNUM, J. L.; PULTZ, M. J.; DONSKEY, C. J. Evaluation of an automated ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens in hospital rooms. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 197, p. 1-8, Jul., 2010.

NGUILE-MAKAO, M.; ZAHAR, J.; FRANÇAIS, A.; TABAH, A.; GARROUSTE-ORGEAS, M.; ALLAOUCHICHE, B.; GOLDGRAN-TOLEDANO, D.; AZOULAY, E.; ADRIE, C.; JAMALI, S.; CLEE'H, C.; SOUWEINE, B.; TIMSIT, J. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: respective impact of main characteristics at ICU admission and VAP onset using conditional logistic regression and multi-state models. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 781-89, May, 2010.

NIEDERMAN, M. S. The clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v. 50, n. 6, p. 788-96, Jun., 2005.

NOGUEIRAS, M.; MARINSALTA, N.; ROUSSEL, M.; NOTARIO, R. Importance of hand germ contamination in health-care workers as possible carriers of nosocomial infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 149-52, May-Jun., 2001.

OBEE, P.; GRIFFITH, C. J.; COOPER, R. A.; BENNION, N. E. An evaluation of different methods for the recovery of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* from environmental surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. 1, p. 35-41, Jan., 2007

OLIVEIRA, D. G. M.; SOUZA, P. R.; WATANABE, E.; ANDRADE, D. Avaliação da higiene das mãos na perspectiva microbiológica. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 13, n. 3, p. 28-32, Jul./Set., 2010.

ONEN, A.; ÇGDEM, M. K.; GEYIK, M. F.; KOKOGLU, O. F.; OTÇU, S.; OZTURK, H.; DOKUCU, A. I. Epidemiology and control of nosocomial infections in pediatric surgery. **Journal of Hospital Infection**, v. 52, n. 3, p. 166-70, Nov., 2002.

PARK, D. R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v. 50, n. 6, p. 742-63, Jun., 2005.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-13, May, 2010.

PEREIRA, M. S.; MORIYA, T. M.; GIR, E. Infecção hospitalar nos hospitais escola: uma análise sobre seu controle. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 4, n. 1, p. 145-62, Jan., 1996.

PITTET, D.; HARBATH, S.J.; BENNET, J.V.; BRACHMAN, P.S. The intensive care unit infection; **Hospital Infection**, 4^a edição, Philadelphia; Lippincott-Raven Publishers, p. 381-402, 1998.

PITTET, D.; MOUROUGA, P.; PERNEGER, T. V. Compliance with handwashing in a teaching hospital. **Annals Internal of Medicine**, v.130, n.2, p.126-30, Jan., 1999.

PITTET, D. Compliance with hand disinfection and its impact on hospital-acquired infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, Suppl A, p. 40-46, Aug., 2001.

QUADROS, M. E. Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos. 2008. Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.134.

RAINERI, E.; CREMA, L.; DE SILVESTRI, A.; ACQUAROLO, A.; ALBERTARIO F.; CARNEVALE, G.; LATRONICO, N.; PETROSILLO, N.; TINELLI, C.; ZONCADA, A.; PAN, A. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in an intensive care unit: a 10 year analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 67, n. 4, p. 308-15, Dec., 2007.

RELLO, J.; ALLEGRI, C.; RODRIGUEZ, A.; VIDAUR, L.; SIRGO, G.; GOMEZ, F.; AGBAHT, K.; POBO, A.; DIAZ, E. Risk factors for ventilator-associated pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* in presence of recent antibiotic exposure. **Anesthesiology**, v. 105, n. 4, p. 709-14, Oct., 2006.

RICHARDS, M.J.; EDWARDS, J.B.; CULVER, D.H.; GAYNES, R. P. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States National Nosocomial Infections Surveillance System. **Critical Care Medicine**, v. 27; n. 5, p. 887-92, May, 1999.

ROCHA, L. A.; BORGES, L. F. A.; GONTIJO FILHO, P. P. Falta de adesão à lavagem de mãos, ação irritante do uso de sabão e luvas e sua influência na microbiota qualitativa e quantitativa das mãos de enfermeiros. **NewsLab**, v. 82, p. 114-22, 2007.

ROCHA, L. A.; BORGES, L. F. A.; GONTIJO FILHO, P. P. Changes in hands microbiota associated with skin damage because of hand hygiene procedures on the health care workers. **American Journal of Infection Control**, v. 37, n. 2, p. 155-59, Mar., 2009.

ROCHA, L. A.; VILELA, C. A. P.; CEZÁRIO, R. C.; ALMEIDA, A. B.; GONTIJO FILHO, P. P. Ventilator-associated pneumonia in an adult clinical-surgical intensive care unit of a Brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 80-85, Feb., 2008.

RODRIGUES, P. M. A.; CARMO NETO, E.; SANTOS, L. R. C.; KNIBEL, M. F. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1084-91, Nov., 2009.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-43, May, 2011.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Surface disinfection: should we do it? **Journal of Hospital Infection**, v. 48, suppl A: S64-S68, Aug., 2001.

SADER, H. S.; JONES, R. M.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, Feb., 2004.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P. P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infections in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infection Control**, v. 4, n. 3, p. 135-43, Jun., 2000.

SAFDAR, N.; BRADLEY E. A. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 4, p. 310-15, Apr., 2008.

SAFDAR, N.; CRNICH, C. J.; MAKI, D. G. The pathogenesis of Ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. **Respiratory Care**, v. 50, n. 6, p.725-39, Jun., 2005.

SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ, L. D.; ROSALES, S. P. L.; FRAUSTO, M. S. R. The burden of nosocomial infection in the intensive care unit: effects on organ failure, mortality and costs. A nested case-control study. **Archives of Medical Research**, v. 37, n. 3, p. 370-75, Apr., 2006.

SANTOS, H. B.; MACHADO, D. P.; CAMEY, S. A.; KUCHENBECKER, R. S.; BARTH A. L.; WAGNER, M. B. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 328, p. 1-7, Nov., 2010.

SCHUENCK, R. P.; NOUÉR, S. A.; WINTER, C. O.; CAVALCANTE, F. S.; SCOTTI, T. D.; FERREIRA, A. L. P.; MARVAL, M. G.; SANTOS, K. R. N. 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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 434-41, Aug., 2009.

SEXTON, T.; CLARKE, P.; O'NEIL, E.; DILLANE, T.; HUMPHREYS, H. Environmental reservoirs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, n. 2, p. 187-94, Feb., 2006.

SHIOMORI, T.; MIYAMOTO, H.; MAKISHIMA, K.; YOSHIDA, M.; FUJIYOSHI, T.; UDAKA, T.; INABA, T.; HIRAKI, N. Evaluation of bedmaking related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 1, p. 30-35, Jan., 2002.

SILVA, N.; OLIVEIRA, M. BANDEIRA, A. C.; BRITES, C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 191-93, Jun., 2006.

SOUZA, P. R. Análise microbiológica e genético-molecular da biota orotraqueal de paciente crítico: subsídios na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica. 2009. Tese de doutorado Enfermagem fundamental – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 182.

TACCONELLI, E. Screening and isolation for infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 371-77, Dec., 2009.

TEIXEIRA, P. J. Z.; HERTZ, F. T.; CRUZ, D. B.; CARAVER, F.; HALLAL, R. C.; MOREIRA, J. S. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 6, p. 40-48, Nov./Dez., 2004.

TEJERINA, E.; FRUTOS-VIVAR, F.; RESTREPO, M. I.; ANZUETO, A.; ABROUG, F.; PALIZAS, F.; GONZÁLEZ, M.; D'EMPAIRE, G.; APEZTEGUÍA, C.; ESTEBAN, A. Incidence, risk factors, and outcome of ventilator-associated pneumonia. **Journal of Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 56-65, Mar., 2005.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426-39, Jun., 1997.

TOMPKINS, L. S.; FALKOW, S. Molecular biology of virulence and epidemiology. In: GORBACH, S. L.; BARTLLET, J. G.; BLACKLOW, N. R. (Eds.). *Infection Diseases*. Philadelphia; W. B. Saunders company, p. 30-37, 1992.

TURRINI, R. N. T.; SANTO, A. H. Infecção hospitalar e causas múltiplas de morte. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 6, p. 485-90, 2002.

VINCENT, J. L. Ventilator-associated pneumonia. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, n. 4, p. 272-80, Aug., 2004.

XIE, D.; XIONG, W.; LAI, R.; LIU, L.; GAN, X.; WANG, X.; WANG, M.; LOU, Y.; FU, X.; WANG, H.; XIANG, H.; XU, I.; NIE, S. Ventilator-associated pneumonia in intensive care units in Hubei Province, China: a multicentre prospective cohort survey. **Journal of Hospital Infection**, v.78, n. 4, p. 284-88, Aug., 2011.

WANG, J.; WANG, M.; HUANG, Y.; ZHU, M.; WANG, W.; ZHUO, J.; LU, X. Colonization pressure adjusted by degree of environmental contamination: A better indicator for predicting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition. **American Journal of Infection Control**, v. 39, n. 9, p. 763-69, Nov., 2011.

WELLER, T. M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? **Journal of Hospital Infection**, v. 44, n. 3, p. 160-72, Mar., 2000.

WILLIAMS, V. R.; CALLERY, S.; VEARNCOMBE, M.; SIMOR, A. E. The role of colonization pressure in nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Infection Control**, v. 37, n. 2, p. 106-10, Mar., 2009.

WOODFORD, R. C.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, Suppl 1, p. 4-16, Sep., 2009.

8. ANEXOS

Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho, membro do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HC-UFU e professor titular de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, coordenará a pesquisa: Importância do ambiente (Ar e Superfície) e das mãos de profissionais de saúde na epidemiologia de infecções por ORSA em unidade de terapia intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro.

Este trabalho tem como objetivo analisar a epidemiologia de estafilococcias por *Staphylococcus aureus* em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

O paciente abaixo assinado autoriza a coleta de dados demográficos e clínicos, associados à colonização/infecção por *Staphylococcus aureus*, coletados a partir do meu prontuário, assim como a coleta de espécimes na cavidade nasal utilizando swab, amostras de aspirado traqueal de acordo com a rotina hospitalar, o que não acarretará riscos ou benefícios para os pacientes.

Você não terá nenhum ônus ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Tenho plena consciência e total liberdade para me informar quanto ao resultado da pesquisa, bem como desistir a qualquer momento do projeto. Os dados serão discutidos com outros pesquisadores, mas sem que em nenhum momento haja perda de minha privacidade.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor(a).

Assinatura: _____

Assinatura do responsável: _____

Data: ____/____/____

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho

Coordenador da Pesquisa

Tel. 3218 2236

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia

Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG,
CEP:38408-100; Fone: 34-32394531

Anexo II



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A – sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº 026/12 DO RELATÓRIO FINAL PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU:
298/07

Projeto Pesquisa: *“Importância do ambiente (Ar e Superfície) e das mãos profissionais de saúde na epidemiologia de infecções por ORSA em unidade de terapia intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro”.*

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do relatório final proposto.

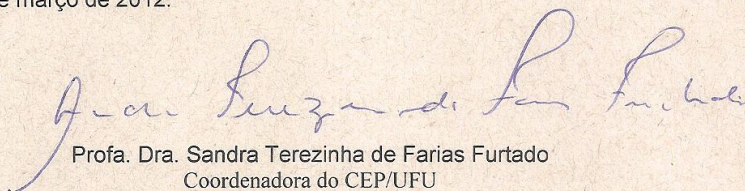
Situação: O relatório final entregue em fevereiro de 2012 não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

SITUAÇÃO: RELATÓRIO FINAL APROVADO.

Uberlândia, 19 de março de 2012.


Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CONEP.

Anexo III

FICHA INDIVIDUAL (UTI DE ADULTOS - PAV)

1-Identificação:

1.1- Ficha n°: _____ 1.2-Prontuário: _____ 1.3-Leito: _____
 1.4- Nome: _____ 1.5- Idade: _____ 1.6- Sexo: F () M ()

2- Data da Internação:

2.1 – Hospital: _____ 2.2- UTI: _____ 2.3- Transferido: _____

3- Evolução:

3.1- Alta: _____ 3.2- Morte: _____ 3.3- Transferido: _____

4- Diagnósticos:

4.1- Doença de base: _____
 4.2- Diagnóstico de admissão/definitivo: _____
 4.3- Pneumonia: S/N VM: S/N
 Escarro purulento: S/N Febre (>38,5°C): S/N Hipotermia(<35°C):S/N
 Leucocitose (>10.000): S/N Diagnóstico radiológico: S/N
 4.4- Diagnóstico microbiológico: _____
 4.5- Outras infecções: S/N Sítio anatômico: _____ Natureza: H/C

5- Fatores de risco:

5.1- Internação prévia: S/N 5.2- Trauma: S/N
 5.3- Cirurgia: S/N 5.3.1- Qual: _____
 5.4- Nível de consciência (coma): S/N
 5.5-Imunocomprometimento: S/N _____
 5.6- Uso prévio de antibióticos: S/N 5.6.1- Quais: _____
 5.7- Uso de procedimento invasivos: S/N
 5.7.1- Quais?: CVC, SV, SNG, SNE, Dreno. Outros _____
 5.8- Prótese ventilatória: Início: _____ Fim: _____

6- Tratamento atual com antibióticos: S/N

6.1- Quais?: _____