ORLANDO JOSÉ BRATFICH

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus epidermidis* ISOLADOS DE INFECÇÕES DE CORRENTE SANGÜÍNEA EM PACIENTES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP

CAMPINAS

2005

ORLANDO JOSÉ BRATFICH

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus epidermidis* ISOLADOS DE INFECÇÕES DE CORRENTE SANGÜÍNEA EM PACIENTES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. MARIA LUIZA MORETTI*

CAMPINAS

2005

DADE BC
CHAMADA UNICAMP
B737e
EX
BO BC/ 66648
16.P.00123-06
R
D 11,00
05/01/06
D
bib ID 3748 68

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B737e

Bratfich, Orlando José

Epidemiologia molecular de *Staphylococcus epidermidis* isolados de infecções de corrente sanguínea em pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP. / Orlando José Bratfich. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Maria Luiza Moretti

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sthapylococcus epidermidis. 2. Infecção Hospitalar. 3. Epidemiologia molecular. 4. Eletroforese em gel de campo pulsado. 5. Epidemiologia molecular. 6. Eletroforese em gel. I. Moretti, Maria Luiza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Sln/fcm)

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): ***Profa Dra. Maria Luiza Moretti***

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida Shikanai Yasuda _____
2. Prof(a). Dr(a). Anna Sara Shafferman Levin-- _____
3. Prof(a). Dr(a). Marcelo Brocchi _____
4. Prof(a). Dr(a). Mariângela Ribeiro Resende _____
5. Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Moretti _____

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/08/2005

Aos Pacientes do Hospital das Clínicas HC – UNICAMP através dos quais conseguimos realizar nossos estudos, dedico.

À minha família, minha mãe Luzia, meu pai Orlando, meus irmãos Vânia e Flávio, os quais sempre me acompanham e apóiam meu desenvolvimento, dedico.

À Profa. Dra. Maria Luiza Moretti por ter me recebido, apoiado, acolhido e orientado, dedico.

À Deus e ao meu Anjo da Guarda, dedico.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Luiza Moretti pela orientação, pela amizade, pelo apoio, pelo carinho, pelo incentivo, pela paciência e por ter aberto as portas de um "Novo Mundo Microbiológico".

Aos funcionários do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, Márcia Pedroso e Érivan Ribeiro pelo apoio, ajuda e incentivo.

À Profa. Dulcinéa Blum-Menezes pelo incentivo, amizade, e acompanhamento no desenvolvimento e na padronização das técnicas moleculares de PCR e PFGE desenvolvidas neste estudo, bem como no preparo dos trabalhos submetidos à publicação.

Ao Prof. Rogério Hakio Kuboyama pela amizade, ajuda e incentivo.

À Profa. Dra. Maria Clara Padoveze pelo ensino e auxílio no manusear e interpretação dos prontuários dos pacientes.

À Profa. Dra. Flora Maria Campos Fernandes, pelo carinho e auxílio no desenvolvimento do estudo filogenético apresentado nesta Tese.

Aos colegas de curso de Pós-Graduação, Ana Beatriz, Ana Bolena, Ana Cecília, Débora, Dulcinéa, Mônica, Maria Sileuda, Rogério Kuboyama, pela convivência, amizade e incentivo.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do HC – UNICAMP, na pessoa da Dra. Ângela von Nowakonski, pela ajuda e dedicação e, principalmente por fornecer as amostras para o banco de bactérias.

Aos funcionários do SAME do HC e do CAISM pela atenção, compreensão e paciência.

Aos funcionários da Biblioteca da FCM, na pessoa da Profa. Dra. Regina Blanco Vicentini, pela cordialidade e competência com que realizam suas funções.

À Câmara de Pesquisa – Serviço de Estatística da FCM – UNICAMP, na pessoa do Sr. Helymar Machado, pelo desenvolvimento das análises estatísticas apresentadas neste estudo.

À Renata Maia da comissão de Pós-Graduação FCM, pelas instruções e acompanhamento.

À Secretaria da Pós-Graduação em Clínica Médica - FCM, Cristiane, Emilia Helena e Eduardo, pela ajuda e paciência e pela resolução de nossos problemas burocráticos.

Às secretárias do Departamento de MI, Nida e Regina pela amizade e apoio.

Aos Docentes, Médicos e Funcionários da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Ciências Médicas, HC – UNICAMP, pela convivência.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta Tese.

No mundo quis o Tempo que se achasse

No mundo quis o Tempo que se achasse
O bem que por acerto ou sorte vinha;
E, por experimentar que dita tinha,
Quis que a Fortuna em mim se experimentasse.

Mas por que meu destino me mostrasse
Que nem ter esperanças me convinha,
Nunca nesta tão longa vida minha
Cousa me deixou ver que desejasse.

Mudando andei costume, terra e estado,
Por ver se se mudava a sorte dura;
A vida pus nas mãos de um leve lenho.

Mas, segundo o que o Céu me tem mostrado,
Já sei que deste meu buscar ventura
Achado tenho já que não a tenho.

Luís de Camões

PÁG.

RESUMO..... *xxxix*

ABSTRACT..... *xliii*

1- INTRODUÇÃO..... 47

1.1- Infecção..... 49

1.2- Os postulados de KOCH..... 50

1.3- O gênero *Staphylococcus*..... 51

1.4- Identificação de *Staphylococcus* spp..... 52

1.4.1- Métodos tradicionais..... 52

1.4.2- Métodos comerciais..... 52

1.5- Tipos de infecções causadas por *Staphylococcus* spp..... 53

1.6- Infecções de corrente sangüínea..... 54

1.7- Análise epidemiológica..... 55

1.8- Importância clínica dos *Staphylococcus* spp..... 56

1.8.1- Densidade populacional..... 56

1.8.2- Adesão a superfícies..... 57

1.8.3- Prevalência de *Staphylococcus* spp na infecção de corrente sangüínea..... 58

1.9- Resistência de *Staphylococcus* spp aos antimicrobianos..... 58

1.9.1- Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *S. epidermidis*.. 60

1.9.2-A origem da resistência a oxacilina..... 61

1.9.3- A importância da resistência a oxacilina..... 62

1.9.4-O início da resistência a glicopeptideos..... 62

1.10- Estudos moleculares em *Staphylococcus* spp..... 63

1.11- Métodos moleculares para tipagem de microrganismos com finalidades epidemiológicas..... 66

1.11.1- Métodos moleculares aplicados para o estudo de patógenos hospitalares..... 66

1.11.1.1- Métodos com base no estudo do DNA genômico..... 66

1.11.1.2- Métodos com base no estudo das proteínas..... 66

1.11.2- Técnica de análise plasmidial..... 68

1.11.3- Técnica de eletroforese para análise do DNA cromossômico..... 69

1.11.4- Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição de endonucleases de clivagem freqüente e eletroforese convencional (REA)..... 70

1.11.5- Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição de endonucleases e "Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (PFGE)..... 71

1.11.6- Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase ("Polymerase Chain Reaction" – PCR)..... 72

1.11.7- Reações de seqüenciamento de DNA e RNA..... 74

2- OBJETIVOS..... 77

3- PACIENTES E MÉTODOS..... 81

3.1- Descrição do Hospital de Clínicas – UNICAMP..... 83

3.2- Desenho do estudo..... 83

3.3- Isolados selecionadas para estudo..... 83

A. Critérios de inclusão..... 83

B. Critérios de exclusão..... 84

3.4- Estudo microbiológico de *Staphylococcus epidermidis* isolados de hemoculturas..... 84

3.4.1- Análise fenotípica dos isolados..... 84

3.4.1.1- Estudo dos Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos..... 84

A. Teste de Disco Difusão..... 84

B. Diluição em Agar – "Salt-agar Screening-plate test"..... 85

C. Determinação da Concentração Inibitória Mínima..... 85

D. Caracterização dos isolados "borderline"..... 86

3.4.1.2- Estudo do potencial de aderência dos isolados..... 86

3.4.2- Análise molecular dos isolados..... 87

3.4.2.1- Detecção da presença do gene *mec*A..... 87

3.4.2.2- Seqüenciamento do gene *mec*A..... 88

A. Extração do DNA amplificado..... 88

B. Preparo da amostra para seqüenciamento..... 89

C. Seqüenciamento do gene *mec*A..... 89

3.4.2.3- Análise filogenética do fragmento do gene *mec*A..... 90

3.4.2.4-Depósito das seqüências no GenBank..... 90

3.4.2.5- Análise do grau de similaridade dos isolados por Pulsed-Field Gel Electrophoresis..... 91

3.5- Controle de qualidade..... 92

3.6- Análise dos dados epidemiológicos dos pacientes com bacteremia por *S. epidermidis*..... 93

3.7- Análise estatística dos dados microbiológicos e epidemiológicos..... 94

4- RESULTADOS..... 97

4.1- Análise fenotípica dos isolados..... 99

4.2- Análise molecular dos isolados..... 101

4.3- Análise epidemiológica dos dados dos pacientes..... 113

5- DISCUSSÃO..... 119

6- CONCLUSÕES..... 129

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 133

8- ANEXOS..... 157

AFLP	"Amplified fragment length polymorphism"
AP-PCR	"Arbitrary Primed PCR" Reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários
AS	Agar Sangue de carneiro
ATCC	"American Type Culture Collection" Coleção de cultura americana
BHI	"Brain Heart infusion" Infusão de cérebro e coração
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CCT	Coleção de cultura tropical
CDC	"Centers for Diseases Control and Prevention" Centro de controle e prevenção de doenças
CHEF-DR III	"Contour-clamped homogenous electric field"
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CVC	Cateter venoso central
DD	Disco Difusão
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
EC	Tampão Tris, cloreto de sódio, EDTA, Brij58, desoxicolato de sódio e sarkosyl
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ES	Solução de EDTA e sarkosyl
Gram	Método de Coloração

HC UNICAMP	Hospital das Clínicas – Universidade Estadual de Campinas
Hemato/TMO	Unidade de hematologia e transplante de medula óssea
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
ICS	Infecção de corrente sangüínea
IS	Elemento de inserção
kb	kilobase
LEMDI	Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas
MHoxa	Meio Mueller Hinton com oxacilina
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMWR	"Morbidity and Mortality Weekly Report"
MRSA	*Staphylococcus aureus* meticilina resistente
MRSE	*Staphylococcus epidermidis* meticilina resistente
MW	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	"National Center for Biotechnology Information"
NCCLS	"National Committee for Clinical Laboratory Standards"
NG	Não grupável
NLM	"National Library of Medicine"
NNIS	"National Nosocomial Infections Surveillance" Vigilância Nacional de Infecção Hospitalar
NPP	Nutrição parenteral
OR	Razão de risco
ORF	"Open Reading frame" Fase aberta de leitura

Paup*	"Phylogenetic Analysis Using Parsimony" Analise Filogenética empregando Parcimonia
pb	Pares de bases
PBPs e PBP 2ª	"Penicillin Binding Protein" Proteínas de ligação de penicilinas
PCR	"Polymerase Chain Reaction" Reação em cadeia da polimerase
PFGE	"Pulsed-Field Gel Electrophoresis" Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PYR	Pirrolidonil arilamidase
RAPD	"Randon Amplified Polimorphic PCR" Reação em cadeia da polimerase empregando iniciadores randômicos
REA	"Restriction Endonucleases Analysis" Analise de restrição por endonuclease
RFLP	"Restriction Fragment Length Polymorphisms" Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SCN	*Staphylococcus* coagulase negativa
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
TE	Tampão Tris EDTA
TSB	"Tryptic Soy Broth " Caldo de soja triptica
TrN	Tamura Nei (modelo de substituição de nucleotídeos)
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/cm^2	Unidades Formadoras de Colônias por centímetro quadrado
UPGMA	"Unweighted Pair Group Method using Averages"

UTI	Unidade de terapia intensiva
VRE	Enterococo resistentes a vancomicina
^{o}C	Graus Centígrados
µm	micrômetro
µg	microgramas
µg/mL	microgramas por mililitro

PÁG.

Tabela1- Resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de *S. epidermidis* provenientes das hemoculturas dos pacientes tratados e não tratados como infecção..... 99

Tabela 2- Dados da produção de biofilme dos isolados estudados nos dois grupos distintos..... 101

Tabela 3- Dados da detecção do gene *mec*A dos isolados estudados nos dois grupos distintos..... 101

Tabela 4- Caracterização dos quatro isolados de *S. epidermidis* oxacilina resistentes que apresentaram reação do gene *mec*A negativa através da reação de PCR..... 102

Tabela 5- Distribuição do perfil molecular dos isolados de *S. epidermidis* relacionados com o resultado dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos oxacilina e teicoplanina..... 107

Tabela 6- Descrição das variáveis qualitativas categóricas, variáveis contínuas e estatística descritiva dos dados analisados neste estudo..... 115

Tabela 7- Fatores de risco analisados para os pacientes distribuídos nos grupos de tratados e não tratados como infecção de corrente sangüínea por *S. epidermidis*..... 116

Tabela 8- Análise de regressão logística univariada dicotômica dos fatores de risco na discriminação dos pacientes tratados e os não tratados como infecção..... 116

Tabela 9- Descrição da especialidade clínica a qual pertenciam os pacientes que evoluíram para óbito no grupo de pacientes tratados e não tratados como infecção..... 116

PÁG.

Figura 1- Ilustração gráfica dos efeitos da introdução da terapia antimicrobiana sobre a microbiota nosocomial e a adaptação dos diferentes microrganismos frente à evolução da ciência médica... 59

Figura 2- Teste da produção de biofilme reação em tubos segundo técnica de Christensen e colaboradores. Tubo 1, não inoculado tubo 2, amostra negativa tubos 3 e 4 amostras positivas..... 100

Figura 3- Fotografia do gel da eletroforese do produto da PCR para detecção do gene *mec*A para os isolados estudados. MW Marcador de peso molecular de 100 pb linhas 1 e 5 isolados com reação de PCR negativa para o gene *mec*A linhas 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 e 11 isolados com reação de PCR positiva para o gene *mec*A linha 7 controle da reação de PCR..... 102

Figura 4- Árvore gênica baseada na seqüência de nucleotídeos do gene *mec*A. O programa Paup* foi utilizado para a construção da árvore empregando o modelo de substituição segundo Tamura Nei (TrN determinado através do modeltest versão 3.06, 2000) para parâmetros de máxima Verossimilhança (–lnL 1153.5603). A seqüência do gene *mec*A de *Staphylococcus sciuri* NCBI Y3094 (WU et al., 1998) foi utilizada como grupo externo..... 104

Figura 5- PFGE demonstrando os diferentes perfis moleculares dos isolados de *S. epidermidis*, obtidos através da digestão do DNA com enzima de macrorrestrição *Sma*I. **λ,** marcador de peso molecular. A linha 14 corresponde ao isolado que exibiu susceptibilidade reduzida a vancomicina (MIC = 8,0 μg/mL). A – Fotografia do gel dos perfis encontrados; B – Dendrograma..... 106

Figura 6- Distribuição dos perfis moleculares dos 100 isolados de *S. epidermidis*..... 107

Figura 7- PFGE dos isolados teicoplanina resistentes. DNA de *S. epidermidis* digerido com enzima de macrorrestrição *Sma*I. **λ,** marcador de peso molecular. A cepa padrão ATCC 14990 corresponde a *S. epidermidis*, sendo que esta cepa é teicoplanina sensível. A – Fotografia do gel dos perfis encontrados; B – Dendrograma..... 108

Figura 8- Distribuição temporal dos diferentes perfis moleculares de *S. epidermidis* durante o período de 06/1999 a 06/2002. As letras A a L correspondem aos diferentes perfis encontrados NG; se refere aos isolados que apresentaram perfis distintos..... 109

Figura 9- Distribuição dos perfis moleculares dos 12 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da UTI neonatal..... 110

Figura 10- Distribuição dos perfis moleculares dos 9 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da UTI pediátrica/pediatria..... 110

Figura 11- Distribuição dos perfis moleculares dos 36 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da Hematologia..... 111

Figura 12- Distribuição dos perfis moleculares dos 7 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da emergência clínica..... 111

Figura 13- Distribuição dos perfis moleculares dos 16 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da clínica médica..... 112

Figura 14- Distribuição dos perfis moleculares dos 5 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da clínica cirúrgica..... 112

Figura 15- Distribuição gráfica referente à especialidade médica a qual pertenciam os pacientes incluídos nesta análise..... 114

RESUMO

Isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de infecções de corrente sangüínea do hospital de clínicas HC – UNICAMP, Campinas foram analisados. Os isolados foram caracterizados por análises fenotípicas e genotípicas. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados para comparar os métodos de disco difusão, concentração inibitória mínima e diluição em Agar, para determinar a relevância clínica da resistência aos antimicrobianos. Foram analisados a presença do gene *mec*A por PCR, produção de biofilme, genotipagem por PFGE com enzima *Sma*I. Dados epidemiológicos dos pacientes foram analisados para detectar a importância clínica dessas cepas. Para oxacilina 82 isolados foram resistentes, sendo que 78 (95,12%) apresentaram reação de PCR positiva para o gene *mec*A, dois isolados apresentaram-se como hiperprodutores de β-lactamases. Para teicoplanina os testes de CIM apresentaram 52 isolados sensíveis, 35 isolados intermediários e 13 isolados resistentes e, quando comparado com os testes de disco difusão foram observadas discordâncias em 43% dos isolados, onde o teste de disco difusão não foi capaz de identificar isolados intermediários e resistentes ($P < 0,001$). Para vancomicina um único isolado apresentou resultado intermediário com CIM de 8,0 μg/mL. Isolados vancomicina resistentes não foram observados. Analises dos dados epidemiológicos, através de regressão logística, as variáveis estatisticamente significantes foram neutropenia ($P = 0,002$) e quimioterapia ($P = 0,015$). As análises genotípicas por PFGE demonstraram a disseminação clonal de *S. epidermidis* no ambiente hospitalar e verificou-se que testes dilucionais são necessários quando se estudam glicopeptideos. A análise filogenética demonstrou grande estabilidade e adaptabilidade genética do gene *mec*A responsável pela resistência a oxacilina.

ABSTRACT

Clinical strains of *Staphylococcus epidermidis* taken from bloodstream infection from UNICAMP (teaching hospital in Campinas São Paulo State, Brazil) were analyzed. The strains were characterized by phenotypic and genotypic analysis. The antimicrobial susceptibility tests were made to compare the disk diffusion tests, MIC, and agar-salt screening-test to determine the relevant clinical antimicrobial resistance. There were also made PCR assays for *mec*A detection, biofilm production, genotypic by *Sma*I-digested and pulsed-field gel electrophoresis. Patients epidemiological data were employed to determine the major clinical importance of these strains. For oxacillin 82 strains were resistant, and 78 (95.12%) had positive PCR assay for *mecA* gene, and two strains presented characteristics of β-lactamases hyperproduction. In the MIC tests for teicoplanin, 52 strains were susceptible; 35 strains intermediate and 13 strains were resistant, and when compared to the results obtained by disk diffusion tests, MIC, were observed discordant results in 43% of the strains where the disk diffusion test was not able to identify strains intermediate and resistant ($P < 0.001$). MIC test had only one intermediate of 8.0 µg/mL for vancomycin. Strains vancomycin-resistant were not observed. The variable data statistically significant in the logistic regression analysis related to the treatment of the BSI by *S. epidermidis* were: neutropenia ($P = 0.002$) and chemotherapy ($P = 0.015$). The genotyping analysis of isolates demonstrated a clonal distribution of *S. epidermidis* in the hospital environment and it was checked that dilution tests are necessary when glycopeptides are being studied.. The phylogenetic analysis showed great genetic stability and adaptability of the *mec*A gene responsible for the oxacillin resistance.

1- INTRODUÇÃO

Microrganismos tidos como comensais podem ser críticos para a existência humana. Muitas vezes causam doenças em hospedeiros debilitados e imunologicamente comprometidos, dentre os quais muitos são isolados da própria microbiota destes pacientes, tais como pele e nasofaringe. Estes microrganismos têm como fator de virulência a sua capacidade de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo através de síntese de substâncias antifagocitárias, ou produzindo proteases específicas capazes de degradar anticorpos e até mesmo "enganando" o sistema imune. A virulência destes microrganismos está relacionada ao potencial de colonização persistente e não propriamente a causar doenças. A linha divisória entre colonização e doença depende dos fatores de interação fisiológicos e genéticos do complexo patógeno-hospedeiro (MERRELL e FALKOW, 2004).

Nesse sentido o hospital tem um papel fundamental na aquisição de patógenos, pois é um ambiente onde os microrganismos podem ser transferidos de um indivíduo ao outro, podendo esta transmissão ocorrer de diferentes formas, onde esta transmissão pode ser direta, por contato manual, ou indireta, por inalação, ingestão ou por penetração através da pele (SNYDMAN, 1994). Os exemplos são dados pelas infecções devidas aos estafilococos resistentes a meticilina, que se disseminam de forma direta entre os pacientes hospitalizados, sendo estas as maiores causas de infecções hospitalares (KREDIET et al., 2001; ROBINSON e ENRIGHT, 2003).

A entrada de microrganismos na corrente sangüínea pode gerar uma bacteremia transitória, temporária ou verdadeira, podendo chegar ao ponto mais grave que é a septicemia (do grego *Septikos*, que produz putrefação + *haima*, sangue). Muitos fatores podem influenciar a entrada e ou permanência de microrganismos no hospedeiro, o qual pode estar mais ou menos susceptível a estes agentes, bem como os efeitos produzidos por estes podem ser variáveis.

1.1- Infecção

Segundo a "Encyclopaedia Britannica", infecção, em medicina, é definida como a invasão de um organismo por qualquer dos vários agentes infecciosos incluindo bactérias, vírus, fungos, protozoários e vermes e a reação do organismo com estes ou suas toxinas.

Quando a saúde não é alterada, o processo é denominado infecção subclínica. Quando a saúde é alterada o processo é conhecido como doença infecciosa (BRITANNICA.COM, 2005). Pode ser considerada como um termo para ilustrar uma situação equivalente a colonização de um indivíduo por um microrganismo. Existem graus de infecção que podem variar de uma forma branda com sintomas subclínicos a graus elevados com manifestações agudas, crônicas e fulminantes (ISENBERG, 1988).

1.2- OS postulados de KOCH

No final do século 19, pesquisadores como Pasteur e Koch demonstraram a capacidade dos microrganismos em causar doenças infecciosas. Através de sua grande capacidade de observação e avaliação Koch nos forneceu os seus célebres Postulados (KONEMAM et al., 1997), os quais são compostos de 4 itens:

1. Um dado organismo deve estar presente em qualquer caso de uma dada doença infecciosa;
2. O microrganismo pode ser isolado de amostras associadas com aquele estado da doença;
3. A inoculação do isolado em animais sensíveis produzirá uma doença igual;
4. A qualquer organismo que é associado com um estado de doença pode ser reconhecido através de amostras representativas de animais infectados experimentalmente.

Algumas considerações devem ser feitas quanto aos Postulados de Koch. O nicho ecológico de um microrganismo específico deve ser levado em conta quando se estuda um modelo animal, bem como a dose infectante, ou seja, quanto será necessário para causar o início da infecção onde, este número nunca é o mesmo para diferentes microrganismos. As interações entre os microrganismos em infecções polimicrobianas e nosocomiais raramente cumprem os princípios de Koch, dependem, portanto, das condições do hospedeiro e de suas próprias interações. Entre outras considerações uma doença infecciosa pode ser reconhecida como um distúrbio natural no equilíbrio complexo do patógeno-hospedeiro (ISENBERG, 1988; MERRELL e FALKOW, 2004).

Mesmo tendo se tornado obsoletos, os Postulados de Koch são a base para o estabelecimento de microrganismos como causadores de doenças (KONEMAM et al., 1997). Um dos principais motivos desse Postulado ter se tornado obsoleto foi o advento de técnicas moleculares para diagnosticar infecções causadas por microrganismos. A não necessidade do isolamento do agente infeccioso e sim o seu conteúdo genômico tornaram estes princípios ultrapassados (ISENBERG, 1988; KONEMAM et al., 1997), embora o isolamento do conteúdo genômico somente, de um dado microrganismo, não signifique exatamente uma infecção ativa.

1.3- O gênero *Staphylococcus*

São bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae*, possuem células esféricas (0,5 – 1,5 μm), Gram positivas que podem ser encontradas isoladas, aos pares e em grupamentos irregulares. São imóveis e não esporuladas. São anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas com metabolismo fermentativo e respiratório. A temperatura ótima de crescimento é de 30 – 37^{o}C. Estão associadas à pele e membranas mucosas de animais vertebrados de sangue quente, podendo ser eventualmente isolados de produtos alimentares, poeira e água. Muitas espécies são patogênicas para o homem e animais. Produzem toxinas extracelulares. *Staphylococcus aureus* é a espécie tipo (HOLT et al., 1994).

O gênero *Staphylococcus* é composto atualmente por 35 espécies, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. arlettae, S. equorum*, *S. kloosii*, *S. gallinarum*, *S. muscae*, *S. felis*, *S. simulans*, *S. carnosus*, *S. piscifermentans*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. lentus*, *S. vitulinus*, *S. sciuri*, *S. pasteuri*, *S. succinus*, *S. condimenti*, *S. lutrae*, *S. fleurettii*. Também são encontradas subespécies, sendo elas *S. aureus* subespécie *aureus* e subespécie *anaerobius*, *S capitis* subespécie *capitis* e subespécie *urealyticus*, *S. cohnii* subespécie *cohnii* e subespécie *urealyticus*, *S. schleiferi* subespécie *schleiferi* e subespécie *coagulans*, *S. hominis* subespécie *hominis* e subespécie *novobiosepticus*, *S. saprophyticus* subespécie *saprophyticus* e subespécie *bovis*, *S. carnosus* subespécie *carnosus* e subespécie

utilis, *S. sciuri* subespécie *sciuri* e subespécie *carnaticus* e subespécie *rodentium* (KLOOS e BANNERMAN, 1994; BANNERMAN, 2003).

Dentre estas espécies e subespécies, oito são de grande importância clínica. *Staphylococcus aureus* é a espécie de maior importância, denominado como coagulase positiva e o segundo em importância é *Staphylococcus epidermidis* reconhecidamente como coagulase negativa (SCN) mais isolado em amostras clínicas. Outros de importância clínica são: *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* subespécie *schleiferi*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (BANNERMAN, 2003).

1.4- Identificação de *Staphylococcus* spp

1.4.1- Métodos tradicionais

Staphylococcus spp com maior significação clínica são identificados tradicionalmente através de suas características fenotípicas como pigmentação da colônia, produção de coagulase, fator "clumping", termonuclease, atividade de fosfatase, atividade de pirrolidonil arilamidase (PYR), ornitina decarboxilase, produção de urease, β-galactosidase, produção de acetoína, resistência a novobiocina, resistência a polimixina B, produção de ácido a partir de uma variedade de carboidratos, tais como trealose, manitol, manose, turanose, xilose, celobiose, maltose e sacarose (BANNERMAN, 2003).

1.4.2- Métodos comerciais

Uma variedade de "Kits" comerciais está disponível, tais como API STAPH – IDENT (bioMérieux Vitek), API STAPH-IDENT, STAPH Trac System e ID 32 STAPH (bioMérieux Vitek), Gram Positive Identification Card (bioMérieux Vitek), painel MicroScan Pos ID, painel MicroScan Rapid Pos ID e Pos Combo tipo 6 e Rapid Pos Combo tipo 1 (Dade MicroScan, Inc., West Sacramento, Califórnia), Minitek Gram-Positive Set e Crystal rapid Gram-Positive Identification System (Becton Dickinson Bioscience). Estes testes apresentam rapidez na identificação e uma acurácia de aproximadamente 70 a 90% (BANNERMAN, 2003).

1.5- Tipos de infecções causadas por *Staphylococcus* spp

A partir da década de 80, após o aparecimento de diversos trabalhos publicados sobre SCN, estes microrganismos passaram a ganhar importância clínica sendo, portanto, reconhecidos como potenciais agentes causadores de doenças, embora nos idos de 1965 PULVERER apresentou em um simpósio a sua angústia pela recusa, de uma revista alemã, em publicar um artigo de sua autoria no qual este autor relatava um caso de endocardite fatal por SCN, embora em 1958 SMITH e colaboradores já haviam notado o potencial patogênico destes microrganismos (KLOOS e BANNERMAN, 1994).

O encontro de *Staphylococcus* sp nos diferentes sítios anatômicos pode estar ou não envolvido em processos patológicos no hospedeiro. Análises de amostras clínicas, tais como trato respiratório, trato genito-urinário, pele e olho demonstram que estes microrganismos são comumente encontrados em amostras clínicas e quando presentes ocasionalmente podem estar envolvidos na produção de doenças. Em amostras de trato gastrintestinal e ouvido estes microrganismos podem ser ocasionalmente encontrados e quando presentes podem, ocasionalmente, estar envolvidos na produção de doenças (BANNERMAN, 2003).

S. epidermidis é o principal SCN encontrado em amostras clínicas e as infecções causadas por este microrganismo são bastante variadas e incluem bacteremias, infecção de válvulas cardíacas, infecção de próteses de válvulas cardíacas, osteomielites, pioartrites, peritonites durante processos de hemodiálises ambulatoriais, mediastinites, prostatites, infecção de marcapassos permanentes, cateteres intravasculares, líquido cefalorraquidiano, uma grande variedade de aparelhos ortopédicos e infecções do trato urinário entre outras (KLOOS e BANNERMAN, 1994; KONEMAN et al., 1997, BANNERMAN, 2003).

Outros SCN como *S. saprophyticus* podem causar cistite aguda ou pielonefrite principalmente em mulheres jovens; *S. haemolyticus* infectam válvulas cardíacas, causam septicemias, peritonites, infecções de articulações, feridas, ossos e infecções do trato urinário; *S. hominis* causam endocardites, peritonites, septicemias e artrites; *S. warneri* causam osteomielite vertebral, infecções de válvulas cardíacas, infecções do trato urinário; *S. simulans* podem causar osteomielite crônica e pioartrite (KLOOS e BANNERMAN, 1994; BANNERMAN, 2003).

1.6-Infecções de corrente sangüínea

Em 1988 o "Centers for Diseases Control and Prevention" (CDC) formulou um algoritmo para definição de infecções nosocomiais, combinando através destas definições dados clínicos e laboratoriais, incluindo novos avanços da tecnologia diagnóstica, levando em consideração aspectos diferentes para pacientes neonatos, crianças e adultos. A infecção de corrente sangüínea (ICS) contempla a sepse microbiologicamente comprovada e a sepse clínica (GARNER et al., 1988). Esse algoritmo é composto dos seguintes tópicos:

1. Nos casos de sepse microbiologicamente comprovada um dos critérios a seguir, como o microrganismo isolado na hemocultura e não relacionado a outro sítio, com exceção de cateter venoso central (CVC) associado, juntamente com febre (> 38ºC), calafrios e hipotensão, associados ao microrganismo isolado de duas amostras de hemocultura, quando em casos de bactérias provenientes da microbiota normal de pele, ou este microrganismo isolado concomitantemente de CVC e com administração de antibioticoterapia adequada. Para pacientes menores de 12 meses de idade os sinais listados anteriormente são válidos, onde se incluem hipotermia (< 37ºC) e o microrganismo isolado de duas amostras de hemocultura pode ou não estar associado ao CVC.

2. Para sepse clínica um dos seguintes sinais sem outra causa aparente devem ser observados, tais como febre (> 38ºC), hipotensão (pressão sistólica ≤ 90 mmHg) ou oligúria (< 20 mL/h), com hemocultura negativa, ausência de infecção aparente em outros sítios, com administração de antibioticoterapia apropriada para sepse. Em pacientes menores de 12 meses de idade um dos seguintes sinais sem outras causas aparentes devem ser observados, tais como febre (> 38ºC), hipotermia (< 37ºC), apneia, bradicardia e hemocultura negativa sem infecção aparente em outro sítio, com administração de antibioticoterapia adequada instituída para sepse.

Além de estabelecer as definições básicas para o diagnóstico da ICS, o CDC sugere adaptações dos protocolos de estabelecimento de infecções nosocomiais sugerindo o estudo de elementos que favoreçam e facilitem a tomada de ações de controle, analisando o

tipo de paciente atendido no hospital, os diferentes microrganismos isolados, gerando desta forma protocolos próprios para as diferentes instituições. Como por exemplo podemos citar o desenvolvimento de protocolos para definição de infecção hospitalar e infecção de corrente sangüínea em pacientes internados em unidade de terapia intensiva de queimados, tendo estes pacientes características diferenciais dos demais pacientes atendidos em outras unidades hospitalares (SANTUCCI et al., 2003), tais como mudanças na coloração da pele atingida, formação de edema, hiperglicemia, confusão mental, além dos outros critérios básicos citados anteriormente.

A ICS é uma das maiores causas de infecções nosocomiais no mundo atualmente, sendo que, este tipo de infecção está estritamente relacionado ao uso de CVC e a educação continuada bem como o emprego e desenvolvimento de protocolos para a prevenção de ICS relacionada a CVC devem ser transformadas em ações constituindo atitudes capazes de diminuir a incidência deste tipo de infecção tendo impacto direto na morbimortalidade dos pacientes (LOBO et al., 2005).

Dados levantados pelo CDC através da Vigilância Nacional de Infecção Hospitalar (NNIS) registram um estudo retroativo de 25 anos no qual, cerca de 270 instituições repassaram os seus dados para este centro. Esses dados demonstraram claramente o aumento de infecções causadas por microrganismos patogênicos Gram positivos, especialmente entre os anos 90 e 96 quando as infecções corresponderam a 34 % do total (WEINSTEIN, 1998). Infecções da corrente sangüínea são destacadas com grande importância principalmente quanto à alta mortalidade atribuída aos diferentes patógenos investigados, com dados variando de 14% para SCN a 37% para os enterococos resistentes a vancomicina (DIEKEMA E PFALLER, 2003).

1.7-Análise epidemiológica

A utilização de métodos moleculares tornou possível um processo de análise de múltiplos isolados onde, pôde-se verificar se estes isolados representam um único isolado ou múltiplos clones.

Diversas unidades clínicas hospitalares podem solicitar este tipo de análise para verificação dos microrganismos isolados, analisando se são isolados iguais ou relacionados, correspondendo a infecções repetitivas, ou se são isolados diferentes o que caracterizam novos processos infecciosos. Este tipo de estudo contribui para o desenvolvimento de novas ações, tanto para a epidemiologia quanto para a patogênese da infecção. Estudos recentes de microbiologia de populações têm demonstrado uma substancial diversidade de espécies microbianas, contribuindo assim para a formação de linhagens geneticamente diferentes. Este tipo de análise permite, ainda, verificar que microrganismos patogênicos e virulentos têm um precursor comum, já os de baixa virulência podem apresentar uma grande diversidade (SLOOS et al., 1998; VAN ELDERE et al., 2002; FINKELSTEIN et al., 2002; SOLL et al., 2003).

Com o desenvolvimento de um grande número de ferramentas moleculares empregadas aos estudos epidemiológicos uma análise crítica deve ser desenvolvida no momento da escolha da metodologia empregada, baseada no estabelecimento do problema ou questões a serem respondidas para a escolha do melhor método a ser empregado.

1.8- Importância clínica de *Staphylococcus* spp

1.8.1- Densidade populacional

O encontro de *Staphylococcus* sp no corpo humano pode variar bastante dependendo do sítio analisado. Em locais úmidos como a narina anterior, axilas e áreas perianal e inguinal a população pode chegar a densidades de 10^3 a 10^6 Unidades Formadoras de Colônias por cm^2 (UFC/cm^2). Em locais considerados menos úmidos pode-se ter uma população de 10 a 10^3 UFC/cm^2. Ainda pode ocorrer uma preferência por locais, como por exemplo, *S. capitis* pela cabeça humana, *S. auricularis* pelo ouvido externo e *S. aureus* pela narina anterior (KLOOS e BANNERMAN, 1994).

Como um exemplo do estado de portador de SCN em um sítio específico pode ser verificado no estudo de TRINDADE e colaboradores, os quais estudaram a microbiota conjuntival de funcionários de um Hospital de Clínicas em Aracaju. *S. epidermidis* foi

encontrado em 45 % dos funcionários daquele serviço, sendo este o microrganismo isolado em maior número. Os autores consideraram que esses profissionais são contaminados pelo ambiente externo e ressaltaram a importância dos mecanismos de defesa do organismo para que esses microrganismos não se instalem e não invadam os hospedeiros (TRINDADE et al., 2000).

1.8.2- Adesão a superfícies

Um dos primeiros relatos científicos que associaram a produção de uma substância mucoide, produzida por estafilococos, como um possível fator de colonização foi o de Bayston e Penny em 1972, onde os autores reconheciam este produto formado como um dos fatores de virulência produzido por *S. epidermidis* em uma amostra isolada de liquido cefalorraquidiano (CHRISTENSEN et al., 1982).

A produção de adesinas por SCN é caracterizada por materiais extracelulares conhecidos por biofilme, o qual é composto por uma mistura complexa de monossacarídeos, principalmente por galactose e glicosamina, capaz de fornecer a estes microrganismos a capacidade de adesão a materiais sintéticos. O principal SCN produtor de biofilme é *S. epidermidis*. A produção desta adesina é mediada pelo gene *ica*, muito comum entre os SCN encontrados e isolados de infecções clínicas significantes provocando, principalmente, endocardites podendo chegar a 47% dos casos de infecções de corrente sangüínea, sugerindo que este mecanismo é o responsável pela persistência bacteriana e a manutenção da infecção no hospedeiro (TOJO et al., 1988; RUPP e ARCHER, 1992 DONLAN, 2001). O biofilme é caracterizado como um fator de virulência de Staphylococcus spp, sendo altamente resistente a tratamentos com antimicrobianos, revelando microrganismos refratários ao tratamento devido ao consórcio formado nesta matriz polissacarídica, demonstrando a capacidade destes isolados em inibir a proliferação de linfócitos T, interações com a gênese de linfócitos B com conseqüente diminuição da produção de imunoglobulinas, interferindo até mesmo com a fagocitose e a morte intracelular (KLOOS e BANNERMAN, 1994).

1.8.3- Prevalência de *Staphylococcus* spp na infecção de corrente sangüínea

Os SCN são os microrganismos mais freqüentemente isolados em hemoculturas, embora tenham sido considerados contaminantes devido a sua alta incidência na pele. Em muitos laboratórios o índice de contaminação é considerado da ordem de 2 a 3 %. Uma bacteremia verdadeira por SCN deve ser considerada quando este microrganismo crescer no meio de cultura até 48 horas após a coleta. O crescimento destes microrganismos em hemoculturas durante a administração efetiva de antibioticoterapia seguida de culturas negativas são reconhecidas mais como contaminantes. Num estudo de 11.092 hemoculturas analisadas, 896 foram positivas (8,1 %), deste total 41,2 % foram positivas para SCN (369 amostras). Deste total, 228 foram isolados de coletas únicas, 141 isolados em duas ou mais amostras (KHATIB et al., 1995).

Dados do NNIS revelam que SCN correspondem a 33,5 % das infecções de corrente sangüínea, sendo estes os microrganismos mais isolados. Em segundo lugar encontram-se *S. aureus* com 13,4 % e em terceiro lugar *Enterococcus sp* com 12,8 %. Esses dados de vigilância nacional demonstram ainda o aumento de resistência a antimicrobianos nos isolados de SCN, principalmente para oxacilina, onde, de 1.881 microrganismos isolados 49% (922 isolados) apresentaram–se resistentes a este antimicrobiano (WEBER et al., 1999). São relatados índices de resistência, a oxacilina, da ordem de 50 a 70% dos isolados (LIVERMORE, 2000).

Dados nacionais (SADER et al., 1999) reportam *S. epidermidis* como terceiro agente mais isolado de infecções de corrente sangüínea e como segundo agente mais isolado na América Latina, apresentando taxas da ordem de 80% de resistência a oxacilina nestes estudos (SADER et al., 2001; CHANG et al., 2003).

1.9- Resistência de *Staphylococcus* spp aos antimicrobianos

O aumento da resistência aos antimicrobianos tem se tornado um grave problema nas duas últimas décadas, em que, principalmente as bactérias Gram positivas têm contribuído de maneira muito significativa para este aumento.

Na figura 1 observa-se um esquema clássico, do que ocorreu nos Estados Unidos, referente aos eventos relacionados com a introdução da terapia antimicrobiana sobre a microbiota nosocomial. Em 1941 iniciou-se o tratamento de estafilococos com penicilina e, em 10 anos, 60% dos isolados tornaram-se resistentes. Em 1959 o tratamento de *S. aureus* passou a ser feito com meticilina, sendo que, imediatamente isolados resistentes foram identificados.

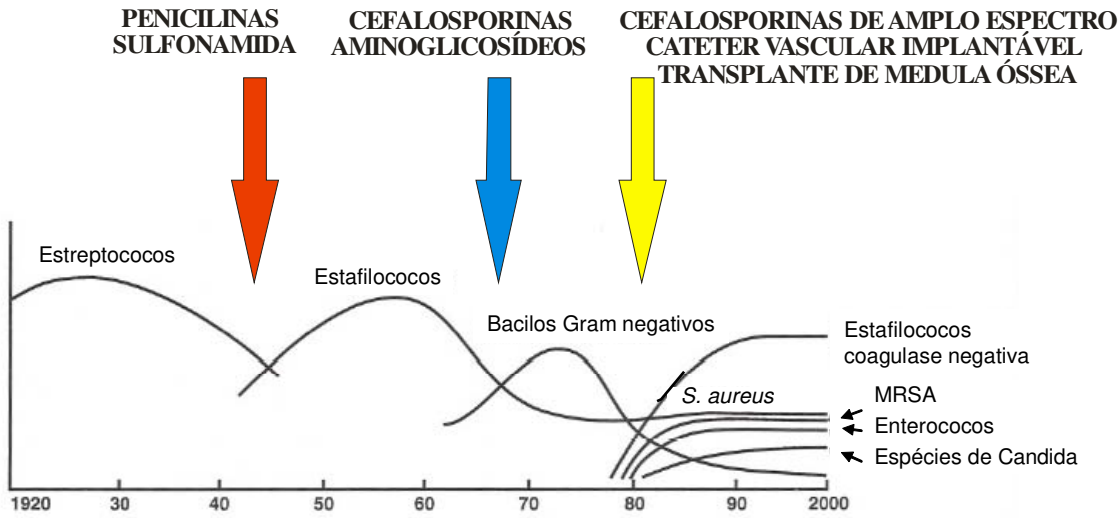


Figura 1- Ilustração dos prováveis efeitos da introdução da terapia antimicrobiana sobre a microbiota nosocomial e a adaptação dos diferentes microrganismos frente à evolução da ciência médica. Adaptado de HERWALDT e WENZEL, 1995. MRSA, *Staphylococcus aureus*

Embora, os fatores de resistência sejam multifatoriais, estes dados demonstram a substituição de nichos pelos microrganismos, onde quando o homem interfere em um dado momento, aplicando um antimicrobiano, o microrganismo causador é removido e o local deixado por este prontamente é substituído por outro diferente ou, muitas vezes, pelo mesmo microrganismo apresentando algum grau de resistência, demonstrando assim a grande capacidade de adaptação dos microrganismos.

Com a evolução da ciência médica promovida pela melhora do diagnóstico das diversas enfermidades, melhora dos equipamentos médicos e por conseqüente melhora dos procedimentos realizados, abriu-se um novo campo para atuação da antibioticoterapia, sendo esta desenvolvida para tratar infecções provocadas por microrganismos emergentes e re-emergentes. Neste sentido a adaptação dos microrganismos às diferentes drogas antimicrobianas empregadas passa pelos diferentes mecanismos de resistência desenvolvidos e caracterizados principalmente por métodos moleculares.

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos podem ser gerados por pressão seletiva e uso excessivo de antibióticos, principalmente em ambientes hospitalares, aumento de pacientes imunocomprometidos, erros no controle de infecção hospitalar, aumento de processos cirúrgicos invasivos e uso indiscriminado de antibióticos na agropecuária (FILE Jr., 1999).

1.9.1- Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *S. epidermidis*

Nos anos 50 a 70 ocorreu o aparecimento de *Staphylococcus* sp resistentes à penicilina, nos anos 60 a 80 verificou-se o aparecimento de *Staphylococcus* sp resistentes a meticilina. No presente encontram-se *Staphylococcus* sp resistentes a meticilina e em um futuro próximo espera-se o surgimento de *Staphylococcus* sp resistentes a vancomicina, tais como *S. aureus* isolado no Japão e nos Estados Unidos (CDC MMWR, 2002). A resistência a antibióticos β-lactâmicos é causada pela alteração das proteínas de ligação das penicilinas (PBPs), relacionada à baixa afinidade deste antimicrobiano a estas proteínas, ou pela produção de enzimas de β-lactamases. No caso de fluoroquinolonas a resistência é causada

pela alteração da DNA girase, nos macrolídeos a resistência é causada pela presença de enzimas metilantes e, para os glicopeptídeos a resistência é causada pela alteração de alvo (CHAMBERS, 1997; FILE Jr., 1999).

1.9.2- A origem da resistência a oxacilina

O antimicrobiano oxacilina é um antibiótico β-lactâmico (Penicilina M) sintético (3-fenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina) muito utilizado na prática médica para tratamento hospitalar de infecções causadas por *Staphylococcus* spp (GILBERT et al., 2003).

Para que os antibióticos β-lactâmicos atuem é necessário que estes penetrem na célula bacteriana através de sua parede celular, inativando alvos específicos localizados na superfície interna da parede celular bacteriana. Se este mecanismo não estiver afetado o antibiótico deverá ligar-se as Proteínas de Ligação das Penicilinas (PBP). Os antibióticos possuem afinidades variáveis às PBPs, onde alterações dessas afinidades ou aquisição de PBPs suplementares sem afinidades pelo antibiótico resultarão em uma resistência adquirida via mutação, a qual poderá ser transmitida verticalmente. Quando o antibiótico β-lactâmico se liga a um ou mais receptores de penicilina a reação de transpeptidação é inibida e a síntese do peptidoglicano é bloqueada e, na seqüência, ocorre a inativação das enzimas autolíticas da parede celular. No caso de *Staphylococcus* spp o principal mecanismo de resistência para oxacilina é a alteração das PBPs (AMATO NETO et al., 1994; CHAMBERS, 1997).

A resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp é heterogênea, conferida principalmente pelo gene *mec*A, correlacionado a baixa afinidade deste antimicrobiano à proteína PBP 2a. Um segundo mecanismo de resistência, independente do gene *mec*A, é o fenótipo denominado "borderline" promovido pela hiperprodução de β-lactamases (MARTINEAU et al., 2000a). Um terceiro mecanismo de resistência descrito é a alteração de outras PBPs (PETERSSON et al., 1999; PETINAKI et al., 2001).

1.9.3- A importância da resistência a oxacilina

A escolha de oxacilina como tratamento primário, em pacientes hospitalizados, será sempre recomendada nos casos de infecções causadas por *Staphylococcus* spp, como endocardite infecciosa, sepse e para pacientes com próteses. Quando do encontro de *Staphylococcus* spp coagulase negativos resistentes a oxacilina, a escolha terapêutica fica muito restrita e neste caso deverá ser utilizado um esquema alternativo, com especial atenção a pacientes portadores de próteses, o principal esquema alternativo é o uso de vancomicina (GILBERT et al., 2003).

Os SCN apresentam aproximadamente 75 % dos isolados resistentes a oxacilina. Estes microrganismos são os principais causadores de infecções nosocomiais, principalmente para pacientes imunocomprometidos, neonatos e em pacientes com próteses internas. Esses microrganismos apresentam o gene *mec*A que codifica a proteína PBP 2a responsável pela resistência a oxacilina. A análise da presença deste gene serve como diagnóstico e ajuda na escolha da melhor terapia antimicrobiana (YORK et al., 1996).

Para pacientes de risco específico como os portadores do vírus HIV, os índices de infecção hospitalar variam de 9 a 16 %. As infecções de corrente sangüínea correspondem à cerca de 35 % destas. O agente de maior freqüência é *S. aureus* com 40 % onde, mais de 90 % destes isolados são meticilina resistente. Os SCN correspondem a 21 % dos isolados. Nestes casos, o uso de vancomicina é recomendado para tratamento de sepse nosocomial (OLIVEIRA JUNIOR et al., 1999).

O uso elevado ou excessivo de vancomicina leva a uma pressão seletiva causando o aumento de isolados resistentes. Os SCN juntamente com *S. aureus* são as maiores causas de mortalidade e morbidade nos hospitais estudados na última década (VON EIFF et al., 2000).

1.9.4- O início da resistência a glicopeptideos

Os primeiros relatos de sensibilidade diminuída a vancomicina foram descritos primeiramente em *S. haemolyticus* (SCHWALBE et al., 1987), em seguida para *S. aureus* (CDC – MMWR, 1997) e em *S. epidermidis* demonstrando resistência heterogênea

(SIERADZKI et al., 1999), onde o mecanismo de resistência envolvido foi um espessamento da parede celular destes isolados, uma vez que este isolados não apresentaram gene de resistência a glicopeptideos envolvidos, mas todos estes isolados eram oxacilina resistentes (TENOVER et al., 2001).

Os primeiros relatos de resistência a vancomicina e teicoplanina foram descritos em 1988 em isolados de *Enterococcus* spp (LECLERCQ et al., 1988) portadores do gene *van*A, o qual codifica a resistência a esta classe de drogas. A disseminação clonal de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina, através do genótipo *van*A já é uma realidade em nosso meio (MORETTI et al., 2004) e uma das principais recomendações e preocupações do CDC já em 1995 era a possibilidade da transferência deste gene de resistência para *Staphylococcus* spp (CDC – MMWR, 1995). Com o primeiro relato em 2002 e, até a data deste estudo são relatados 3 casos de *S. aureus* vancomicina resistentes na literatura (CDC - MMWR, 2004) os quais eram resistentes a oxacilina e a vancomicina/teicoplanina sendo portadores do gene *mec*A e do gene *van*A respectivamente.

Com o aumento da prevalência de *Staphylococcus* spp de uma maneira geral em amostras clínicas e o seu elevado grau de resistência a antimicrobianos de escolha primária, se faz necessário o uso empírico de vancomicina para tratamento das diversas infecções causadas por estes microrganismos. Embora o seu uso seja muitas vezes necessário, o emprego deste antibiótico em larga escala pode acarretar o efeito da pressão seletiva levando ao aparecimento de isolados, principalmente SCN, com sensibilidade diminuída ou mesmo com perfil de resistência a este grupo de drogas. Os SCN podem ser considerados como reservatórios de genes de resistência a diversos antibióticos no ambiente hospitalar podendo, portanto, transferir esses fatores a outros patógenos hospitalares (CERCENADO et al., 1996; TENOVER et al., 1998; SIERADZKI et al., 1999).

1.10- Estudos moleculares em *Staphylococcus* spp

Considerados durante muito tempo como contaminantes de amostras biológicas os SCN, principalmente *S. epidermidis*, começaram a ganhar importância como causadores de infecções verdadeiras, principalmente em infecções de próteses onde, estão associados ao mau funcionamento destas e com considerável mortalidade e morbidade. Estudos de

tipagem molecular começaram a ser utilizados, como por exemplo, o perfil plasmidial que se mostrou capaz de identificar isolados relacionados demonstrando perfis idênticos desses moldes (ARCHER et al., 1984).

A resistência a antimicrobianos mediada por plasmídios pode ser demonstrada por métodos moleculares onde as análises do DNA plasmidial em isolados de SCN são capazes de demonstrar as marcas de resistência, embora para fins epidemiológicos este tipo de estudo não se mostra um método adequado (ARCHER et al., 1985).

S. epidermidis também foi reconhecido como importante patógeno oportunista em pacientes com próteses de válvulas cardíacas e cateteres. Técnicas de fagotipagem e análise plasmidial puderam relacionar amostras demonstrando que as mesmas estavam altamente relacionadas, embora os testes de susceptibilidade a antimicrobianos tenham apresentado resultados distintos (MICKELSEN et al., 1985).

Embora existam dificuldades em se estabelecer se os isolados de *S. epidermidis* provenientes de hemoculturas eram de origem hospitalar de uma coisa já se tinha certeza, esses microrganismos já apresentavam aproximadamente 80 % dos isolados resistentes a oxacilina e altamente implicados em infecções hospitalares. Com o emprego de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) podem-se identificar os isolados altamente relacionadas, com distribuição clonal e, verificar que estes microrganismos podem resistir por longos períodos em instituições, podendo chegar a décadas (HUEBNER et al., 1994; SLOOS et al., 1998), verificando que normalmente estes microrganismos apresentam perfis de multiresistência a drogas (SLOOS et al., 1998). Com emprego de PFGE associado ao uso de enzima de restrição também foi possível relacionar molecularmente isolados de *S. epidermidis* envolvidos em infecções de próteses articulares (GALDBART et al., 1999).

Estudos como o de KHATIB e colaboradores que, através de análise de DNA plasmidial, demonstraram a ocorrência de 21 casos de bacteremia causadas por SCN onde, 18 episódios foram causados por bactérias que apresentaram perfil plasmidial idêntico, sendo 3 episódios identificados por antibiotipo, sendo estes isolados plasmidios-deficientes. Foram considerados isolados relacionados (KHATIB et al., 1995).

BURNIE e colaboradores estudaram *S. epidermidis* isolados de hemoculturas de pacientes internados, em um hospital de Manchester no Reino Unido, nas unidades Neonatal e Hematológica, empregando técnicas de PFGE e RAPD. Através de PFGE aplicado a 146 isolados foram gerados 64 tipos. Na unidade Neonatal foram identificados dois grupos de isolados (tipo A e tipo B) e na unidade de Hematologia um único tipo (tipo C). Através de RAPD encontraram 54 a 58 tipos dependendo do "primer" utilizado. Através destes dois métodos verificaram a presença de 3 tipos distintos de *S. epidermidis*, sem indícios de infecção cruzada entre as unidades. Estas amostras também foram comparadas com resultados das amostras isoladas das mãos de funcionários das unidades e observaram que estas estavam implicadas como meio de transmissão desses microrganismos (BURNIE et al., 1997).

Em um período de 3 anos, VILLARI e colaboradores estudaram as causas de infecções hospitalares em uma unidade de terapia intensiva neonatal do hospital universitário de Nápoles na Itália. O estudo foi voltado principalmente na análise de isolados de *S. epidermidis*, sendo que 30,4 % das infecções neste período foram causadas por este microrganismo. As infecções da corrente sangüínea representaram 39,8 % com um número de 35 infecções. Com uma análise detalhada dos dados obtidos por técnicas moleculares, onde empregaram PFGE e hibridização de DNA, constataram que uma porção significante das infecções causadas por *S. epidermidis* poderia ser atribuída a transmissão entre pacientes e que certos isolados podem tornar-se endêmicos durante longos períodos. Também puderam verificar a presença de infecções cruzadas, onde a maioria dos isolados endêmicos demonstraram ser mais resistente aos antimicrobianos testados do que aqueles que se apresentaram como isolados esporádicos (VILLARI et al., 2000).

O isolamento de *S. epidermidis* de pacientes com septicemia em múltiplas hemoculturas deve ser, usualmente, reconhecido como bacteremia verdadeira. Isolamentos únicos são suspeitos de contaminação. Em estudos epidemiológicos o antibiograma, o PFGE e o AFLP demonstram alto poder discriminatório em relação a outros métodos quando se analisam isolados de *S. epidermidis*, com verificação dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentando multiresistência a drogas, sendo que normalmente estes pacientes são mais graves e a aquisição destes isolados tem em média 21 dias de internação (SLOOS et al., 2000a).

1.11- Métodos moleculares para tipagem de microrganismos com finalidades epidemiológicas

Diversos métodos moleculares têm sido aplicados em estudos epidemiológicos para tipagem de microrganismos responsáveis por infecções hospitalares. Esses métodos podem ser divididos em duas categorias: métodos com base no estudo do DNA genômico e com base no estudo das proteínas.

1.11.1- Métodos moleculares aplicados para o estudo de patógenos hospitalares

1.11.1.1- Métodos com base no estudo do DNA genômico

- análise do perfil plasmidial;
- análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA genômico após a digestão com enzimas de restrição de endonucleases em eletroforese convencional (REA);
- *Southern hybridization* utilizando probes de DNA específicos;
- perfil do DNA genômico utilizando eletroforese em campo pulsátil (PFGE);
- AP-PCR (Arbitrarily primed polymerase chain reaction);

1.11.1.2- Métodos com base no estudo das proteínas

- *immunoblot fingerprint*;
- análise de proteínas celulares por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- *multilocus enzyme electrophoresis*;

Os métodos moleculares genotípicos baseiam-se na análise da estrutura genética dos microrganismos sendo menos sujeitos às variações naturais, embora possam ser afetados por inserções ou deleções de DNA dentro do cromossomo, ganho ou perda de DNA extracromossômico ou mutações aleatórias.

Todos os sistemas podem ser caracterizados em termos de capacidade de tipagem (tipabilidade), reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de execução e de interpretação (TENOVER et al., 1997).

A tipabilidade refere-se à habilidade da técnica em produzir um resultado de tipagem para cada isolado e, portanto, isolados não tipáveis são aqueles que não produzem resultado. Um método para ser considerado reprodutível deve gerar os mesmos resultados, quando um mesmo isolado for testado em repetidos ensaios laboratoriais.

Estudos de tipagem de isolados coletados através de períodos de tempo variáveis (semanas, meses ou anos), podem apresentar pequenas variações nos padrões de DNA genômico quando analisados pelas técnicas de análise plasmidial, PFGE e AP-PCR (MASLOW et al., 1993; VAN BELKUM e MEIS, 1994). O poder discriminatório refere-se à capacidade da técnica em diferenciar isolados não relacionados epidemiologicamente. Idealmente, o método de tipagem deve reconhecer cada isolado não relacionado como único (MASLOW et al., 1993; BINGEN, 1994).

A facilidade de interpretação requer a experiência do profissional em determinado método.

O quadro 1 refere-se às vantagens e desvantagens de diferentes métodos de tipagem molecular com base na análise do DNA (MASLOW e MULLIGAN, 1996; TENOVER et al., 1997).

Quadro 1- Características das técnicas de tipagem molecular baseadas no DNA.

Método de tipagem	Capacidade de tipagem de isolados	Reprodutibilidade	Poder discriminatório	Facilidade de interpretação	Facilidade de execução
Plasmídio	Maioria	Boa	Regular	Moderada	Moderada
REA	Todas	Boa	Bom	Difícil	Moderada
RFLP com probes	Todas	Excelente	Moderada	Moderada	Difícil
PFGE	Todas	Excelente	Excelente	Moderada	Moderada
AP-PCR	Todas	Boa	Boa	Moderada	Moderada

Legenda: REA, análise de restrição por endonuclease; RFLP, Restrição de fragmentos polimórficos; PFGE, Eletroforese em gel com campo pulsado; AP-PCR, Reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários.

1.11.2- Técnica de análise plasmidial

Os plasmídios são elementos genéticos extracromossômicos que podem transferir informação genética entre diferentes isolados bacterianos. A análise plasmidial foi o primeiro método genotípico a ser aplicado em estudos de epidemiologia molecular (ARBER e MACKEL, 1981; SCHABERG et al., 1988), tendo sido empregado, primeiramente para estudar a relação entre padrões não usuais de resistência bacteriana aos antimicrobianos (ARBER e MACKEL, 1981). As técnicas atuais de extração do DNA plasmidial permitem o isolamento rápido dos plasmídios e utilizam o sistema de eletroforese bastante simples para separação dos mesmos, tornando esse método apropriado para diversos laboratórios clínicos. O acréscimo da digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição de endonucleases aumenta o poder discriminatório e a reprodutibilidade da técnica (TOWNSEND et al., 1985). Alguns isolados bacterianos, em especial *Staphylococcus aureus*, contêm apenas um grande plasmídio, freqüentemente de peso molecular entre 100 a 150 kilobases (kb). Nesses casos a adição da enzima de restrição permite aumentar o poder discriminatório na eletroforese (PFALLER et al., 1991).

No entanto, as bactérias Gram negativas usualmente têm um número maior de plasmídios sendo desnecessária, muitas vezes, a realização da digestão com enzimas de restrição de endonucleases (GETCHELL-WHITE et al., 1989; PATTERSON et al., 1991; SEIFERT et al., 1994; MARCOS et al., 1995).

A aplicação da técnica de análise do DNA plasmidial com finalidade de epidemiologia molecular apresenta vantagens e desvantagens. Os plasmídios podem disseminar-se de uma bactéria para outra e, portanto, o encontro de isolados contendo o mesmo perfil plasmidial pode significar que o plasmídio tem o caráter epidêmico e não o isolado bacteriano (FARRAR, 1983). Por outro lado, a presença singular de um ou mais plasmídios pode pertencer a um único isolado bacteriano não epidêmico (WACHSMUTH, 1986). A aplicação da técnica de extração do DNA plasmidial apresenta vantagens como a aplicabilidade em vários gêneros e espécies bacterianas, facilidade e rapidez de execução, reprodutibilidade e baixo custo. No entanto, as seguintes limitações da técnica podem ser citadas como desvantagens: o isolado epidêmico pode não conter plasmídio; isolados não relacionados podem apresentar o mesmo plasmídio; os plasmídios estão sujeitos a re-arranjos estruturais e por serem elementos extracromossômicos, a bactéria pode perder ou ganhar plasmídios não relacionados com o surto (WACHSMUTH, 1986; EISENSTEIN, 1990a; LUPSKI, 1993).

1.11.3- Técnica de eletroforese para análise do DNA cromossômico

Existem dois métodos de tipagem de microrganismos com base nos padrões de fragmentos produzidos pela clivagem do DNA cromossômico com enzimas de restrição de endonuclease.

O primeiro método, usualmente referido como convencional, refere-se à extração do DNA e digestão com enzima de restrição, que digere o DNA em inúmeros fragmentos. Nesse procedimento, os fragmentos de DNA são submetidos à corrida em gel de agarose em eletroforese comum. De acordo com a malha do gel empregado os fragmentos de 0,5 a 2,5 kb apresentam-se como um padrão de bandas visíveis ou como uma

única banda, enquanto fragmentos maiores não são capazes de migrar no gel, ficando retidos na sua borda superior (GOERING e WINTERS, 1992).

A segunda técnica baseia-se na aplicação de eletroforese em campo pulsátil (PFGE), capaz de separar fragmentos de 1 kb até 1.000 kb (1 megabase), usando enzimas de restrição de endonucleases, de baixa freqüência de clivagem do DNA, gerando de 10 a 30 bandas no gel de agarose (BINGEN, 1994; MASLOW e MULLIGAN, 1996; MAULE, 1998).

1.11.4- Análise do dna cromossômico com enzimas de restrição de endonucleases de clivagem freqüente e eletroforese convencional (REA)

Cada enzima de restrição cliva o DNA cromossômico em uma seqüência particular de nucleotídeos os quais podem estar repetidos inúmeras vezes no cromossomo. O número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a freqüência e a distribuição em que essa seqüência é repetida. O padrão de bandas geradas por esse método, em que a distinção entre os microrganismos é feita com base no número e tamanho dos fragmentos, é denominado "Restriction Fragment Length Polymorphisms" (RFLP). Os inúmeros fragmentos separados em eletroforese convencional, resultantes da digestão, dificultam a análise comparativa entre os isolados. Entretanto, para algumas bactérias e leveduras, essa técnica tem-se mostrado útil, como em tipagem de surtos por *Clostridium difficile* (PETERSON e KELLY, 1993) e *Candida tropicalis* (DOEBELLING et al., 1991).

Os fragmentos gerados pela digestão do DNA cromossômico podem ser transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Southern blot) e incubados com probes de DNA, marcados com isótopos radioativos ou substâncias quimioluminescentes. O probe liga-se apenas em áreas de seqüência de DNA complementar, que podem ser visualizadas por exposição da membrana a um filme fotográfico. Quanto mais relacionados entre si forem os microrganismos, mais provavelmente serão identificadas as seqüências pelo probe, produzindo padrões de bandas idênticos ou semelhantes. No entanto, o poder discriminatório dessa técnica é afetado pelo tipo de probe empregado, ou seja, o probe que

detecta uma região que é várias vezes repetida no cromossomo produzirá padrões com mais bandas no gel e, portanto, uma melhor discriminação em relação aos probes que detectam poucas seqüências no cromossomo (WEBER et al., 1997). A técnica de RFLP utilizando o probe IS110 tem sido aplicado especialmente nos estudos de transmissão cruzada e epidemias de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes HIV-positivos (DALEY et al., 1992; TORREA et al., 1996).

1.11.5- Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição de endonucleases e "Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (PFGE)

Os fragmentos de DNA maiores que 20 a 25 kb não são separados pela eletroforese convencional que utiliza corrente elétrica unidirecional. A introdução em 1984 (SCHWARTZ e CANTOR, 1984) do PFGE permitiu a separação de grandes fragmentos de DNA (40 a 1.000 kb) em gel de agarose. A capacidade de separação de grandes moléculas foi facilitada pela alternância de direção da corrente elétrica (CARLE et al., 1986). O número de fragmentos é limitado pelo uso de enzimas de restrição que reconhecem os sítios que ocorrem com baixa freqüência no genoma do microrganismo. O campo elétrico da eletroforese é aplicado em uma determinada direção, por um primeiro grupo de eletrodos, por um curto período de tempo (pulso). A seguir, a corrente é alternada para o segundo grupo de eletrodos e depois para um terceiro grupo. Dessa forma, devido à alternância de direções, o DNA consegue movimentar-se através do gel de agarose, resultando em um alto grau de resolução dos fragmentos no gel (CHU et al., 1986; BANNERMAN et al., 1995; CANTOR et al., 1988).

A técnica de PFGE apresenta importantes vantagens quando comparado a outras técnicas de tipagem molecular, como análise plasmidial, REA e *Southern blot* entre outras, pois o DNA cromossômico é digerido com enzimas de restrição de baixa freqüência de clivagem, permitindo excelente separação de 10 a 30 bandas. Outra vantagem é que o método não necessita de probes, além de ser altamente reprodutível e possuir excelente poder discriminatório, para distinguir isolados endêmicos de não endêmicos. PFGE pode ser aplicado em uma série de microrganismos, em especial as bactérias (GOERING, 1993;

SWAMINATHAN e MATAR, 1993; MASLOW et al., 1993; HARTSTEIN et al., 1995) e as leveduras (PFALLER, 1992). Uma das poucas desvantagens do método está no alto custo do equipamento e na demorada e trabalhosa execução laboratorial.

Bactérias como *S. aureus* tem demonstrado grande transmissibilidade no ambiente hospitalar e os estudos empregando PFGE têm demonstrado ser um método excelente para monitoramento epidemiológico na disseminação de isolados oxacilina resistentes em longos períodos (Beretta et al., 2004), inclusive em estudos de disseminação global de clones resistentes (Stefani e Varaldo, 2003).

A aplicação de tipagem molecular por PFGE passou a ser então o padrão-ouro para análises epidemiológicas sendo, inclusive, utilizada para cariotipagem e genoma microbiano, mapeamento de DNA, formas topológicas, quebras cromossômicas e seqüenciamento entre outras (TENOVER et al., 1997; MAULE, 1998).

1.11.6- Técnica da reação em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction" – PCR)

A técnica de PCR consiste em uma reação composta de três ciclos repetitivos, em um sistema semi-automático capaz de ampliar uma simples fita de DNA ou RNA com 50 a 2.000 pares de bases, para mais de um milhão de vezes em apenas poucas horas (EISENSTEIN, 1990b).

O método de PCR vem sendo usado na prática, muito mais para diagnóstico de infecções do que para fins de epidemiologia molecular na investigação de surtos. Os patógenos que são de difícil crescimento em cultura ou que se encontram em estágio latente ou ainda que requeiram uma resposta de anticorpos para a detecção da doença, podem ser rapidamente identificados por PCR. O PCR, assim como outros sistemas de detecção, tem suas limitações. A seqüência de nucleotídeos do patógeno deve ser conhecida para que o "primer" específico possa ser desenvolvido. Mesmo assim, um resultado positivo de diagnóstico pode não necessariamente significar doença aguda, mas apenas a multiplicação do agente, como na infecção por citomegalovírus (PETER, 1991; TEMPLETON, 1992).

A PCR pode ser utilizada especificamente para a detecção de genes de virulência dos microrganismos em estudo. Através deste método pode-se detectar genes de adesão, formadores de biofilmes, genes que codificam resistência a antimicrobianos e outros, demonstrando assim uma evidência para considerar o microrganismo em estudo como patogênico ou contaminante (FREBOURG et al., 2000).

Análises de RNA ribossomal empregando PCR para regiões 16S e 23S é uma metodologia capaz de tipar e identificar microrganismos em gênero e espécie sem a necessidade do isolamento em cultura, principalmente quando são verificados isolados deficientes nutricionais, condição esta exibida por isolados de *Staphylococcus* spp (KRIMMER et al., 1999). Análises de DNA cromossômico, quando empregadas técnicas de PCR multiplex também utilizam regiões 16S rRNA como controle de reação por se tratarem de locais extremamente conservados no genoma bacteriano (MARTINEAU et al., 1996).

Uma variante do PCR convencional é a "random amplified polymorphic DNA" (RAPD ou AP-PCR). Esta técnica utiliza "primers" arbitrários e tem sido muito aplicada na investigação de surtos intra-hospitalares, em conjunto com outras técnicas moleculares de tipagem, como no estudo das epidemias nosocomiais causadas por *Acinetobacter baumannii* comparando AP-PCR com outras técnicas como PFGE (GRÄSER et al., 1993), ribotipagem (VILA, et al., 1994; SEIFERT & GERNER-SMIDT, 1995) e análise plasmidial (MARCOS, 1995), como também nas investigações dos surtos causados por *S. aureus* resistentes a oxacilina (FANG et al., 1993; TENOVER et al., 1994; KUMARI et al., 1997; TAMBIC et al., 1997).

Outra variante é a ribotipagem empregando PCR nos estudos de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* (OLIVEIRA, 2002), embora o poder discriminatório seja mais relevante em isolados oxacilina sensível do que para os isolado oxacilina resistentes.

Quando se estudam surtos epidemiológicos este método de AP-PCR, quando realizado unicamente, tem se mostrado de baixa reprodutibilidade quando comparado com estudos interlaboratoriais (DEPLANO et al., 1997) por isso se faz necessário o emprego de metodologias conjugadas para análise.

1.11.7- Reações de seqüenciamento de DNA e RNA

Com desenvolvimento de programas computacionais disponíveis no NCBI, como o BlastN para seqüências de nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1997) e o BlastP para seqüências de proteínas (MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004), e o aumento do número de depósitos de seqüências no GenBank por diversos centros mundiais, esse processo diminuiu muito os erros encontrados no passado, como por exemplo o do deposito da seqüência de DNA de dinossauro, obtida à partir de ovo fossilizado, a qual depois de uma re-análise verificou-se que a mesma tratava-se de uma seqüência de DNA de *Escherichia coli* (WANG et al., 1997).

Através das técnicas de seqüenciamento de DNA e RNA foram desenvolvidos estudos de analises filogenéticas aplicadas a seqüências biológicas. O seqüenciamento de genomas completos de microrganismos possibilitam a análise e identificação de ilhas de patogenicidade com o reconhecimento de regiões específicas de diferentes microrganismos (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004). Os testes de BlastN possibilitaram, ainda, reconhecimento de regiões de DNA precursoras de genes de resistência para antimicrobianos, ou regiões homólogas em microrganismos diversos, os quais podem transferir esses genes para outros microrganismos, sendo estes ambientais ou mesmo de grande importância clínica (WU et al., 1998; CHAMBERS, 1999; COUTO et al., 2003; FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004).

Através de análises de regiões 16S rRNA microrganismos puderam ser identificados a nível de espécies (POYART et al., 2001). Estudos empregados para análises de genes de virulência ou resistência comparando isolados provenientes de diversas partes do mundo (HOOKEY et al., 1998), esclarecendo dúvidas em dados de estudos epidemiológicos nos quais as outras técnicas moleculares foram incapazes de discriminar os isolados (JORGENSEN et al., 1996) construindo assim um modelo filogenético destas amostras. Outros estudos também foram capazes de demonstrar linhagens de clones bacterianos responsáveis pela grande maioria de infecções hospitalares, demonstrando a distribuição global de microrganismos resistentes (STEFANI e VARALDO, 2003) sendo, inclusive, capazes de demonstrar evidências de transferências horizontais de genes de

resistência fornecendo bases para propostas de modelos evolucionários em *Staphylococcus* spp (ROBINSON e ENRIGHT, 2003; HANSSEN et al., 2004).

Se a pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos pode selecionar microrganismos no ambiente hospitalar essas Infecções de Corrente Sangüínea são causadas por *S. epidermidis* proveniente da microbiota da pele dos pacientes ou da microbiota hospitalar selecionada?

Ocorre a disseminação clonal desses isolados entre os pacientes?

Esses isolados (clones?) são predominantemente oxacilina resistentes?

Embora na literatura internacional sejam relatados estudos sobre a epidemiologia molecular de *S. epidermidis*, poucos relatos existem de sua importância como causador de ICS nos hospitais brasileiros. Assim foi proposto o presente estudo.

2- OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

A análise dos isolados de *S. epidermidis* responsáveis por infecções hospitalares de corrente sangüínea em pacientes do Hospital de Clínicas – "HC UNICAMP" - Estudo das características fenotípicas e genotípicas:

Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, com ênfase em oxacilina, vancomicina e teicoplanina;

Produção de biofilme pelos isolados estudados;

PCR para detecção do gene *mec*A;

Análise filogenética do gene *mec*A;

Análise do perfil molecular dos isolados empregando PFGE;

Estudo dos dados clínicos e dos fatores de riscos relacionados aos pacientes que apresentaram infecção hospitalar da corrente sangüínea por *S. epidermidis*.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- Descrição do Hospital de Clínicas – UNICAMP

Trata-se de um hospital universitário geral e de referência terciária (Ministério da Saúde, 1985) para a região de Campinas. Possui 450 leitos onde são atendidos pacientes necessitando de diferentes especialidades médicas, à exceção das pertencentes ao Departamento de Tocoginecologia (Obstetrícia, Ginecologia e Oncologia Ginecológica e Mamária) e Berçário de Alto Risco. Tais especialidades são atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), localizado ao lado do HC.

3.2- Desenho do estudo

Foi realizada uma análise retrospectiva com o estudo dos isolado de *S. epidermidis* provenientes de infecção de corrente sangüínea de pacientes internados no hospital das clínicas HC – UNICAMP.

3.3- Isolados selecionados para estudo

A. Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo 100 isolados de *S. epidermidis* provenientes de 100 episódios de bacteremias correspondentes às amostras isoladas de dois ou mais frascos de hemocultura positivos (sistema automatizado BacTAlert, Biomerieux), sendo que este procedimento satisfez o critério de sepse microbiologicamente comprovada, seguindo critérios do Centers for Diseases Control and Prevention - CDC (GARNER et al., 1988). O primeiro isolado de cada paciente foi incluído.

Por se tratar de um microrganismo que pode estar associado a microbiota do paciente, além de duas ou mais amostras de hemoculturas positivas, também foram avaliados os sinais relacionados a sepse clínica, tais como febre, calafrios e hipotensão.

Esses 100 isolados de *S. epidermidis* foram correspondentes a hemocultura de 85 pacientes internados no HC-UNICAMP no período de junho 1999 a junho de 2002.

Os isolados de *S. epidermidis* selecionados, provenientes do banco de bactérias do laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) e estocados em leite desnatado, foram reativados através de cultivo em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com incubação a 35ºC, sob agitação por 24 h; posteriormente as amostras foram semeadas em meio de Agar Sangue (AS) de carneiro (5%) e incubadas a 35ºC por 24 h. As amostras reativadas foram utilizadas em fase exponencial de crescimento para a realização dos testes descritos na seqüência.

B. Critérios de exclusão

Isolados de *S. epidermidis* provenientes de amostras únicas de hemoculturas de pacientes no mesmo período não foram incluídos.

3.4- Estudo microbiológico de *Staphylococcus epidermidis* isolados de hemoculturas

3.4.1. Análise fenotípica dos isolados

3.4.1.1- Estudo dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

A. Teste de Disco Difusão

Numa primeira etapa foram realizados os testes de disco difusão (DD) seguindo normas do "National Committee for Clinical Laboratory Standards", NCCLS M2-A7 (NCCLS, 2000a). A partir das amostras, isoladas em meio de AS, 3 a 4 colônias foram transferidas para tubos contendo 5 mL de meio caldo BHI, incubados em estufa a 35ºC até obter uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. As culturas foram inoculadas em meio de Agar Mueller Hinton utilizando zaragatoa estéril; após 15 min para estabilização das culturas foram adicionadas às placas, discos impregnados com os seguintes antimicrobianos: oxacilina 1µg, vancomicina 30 µg, teicoplanina 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, rifampicina 5 µg, gentamicina 10 µg, amicacina 30 µg, quinupristina-dalfopristina 15 µg; em seguida, após 15 minutos para difusão dos antimicrobianos no meio de cultura, as placas foram incubadas em estufa a 35ºC por 18 a 24 h, sendo que para as drogas oxacilina, vancomicina e teicoplanina o tempo de incubação

de 24 h completas foi rigorosamente cumprido. Os valores de susceptibilidade aos antimicrobianos testados foram interpretados como sensíveis, intermediários ou resistentes segundo tabelas do NCCLS M100-S10 (NCCLS, 2000b), onde os valores de interpretação para oxacilina foram os seguintes, para resistente ≤ 17 mm e sensível ≥ 18 mm; para vancomicina sensível ≥ 15 mm; para teicoplanina foram resistente ≤ 10 mm, intermediário entre 11 – 13 mm e sensível ≥ 14 mm; para ciprofloxacina foram resistente ≤ 15 mm, intermediário entre 16 – 20 mm e sensível ≥ 21 mm; para rifampicina foram resistente ≤ 16 mm, intermediário entre 17 – 19 mm e sensível ≥ 20 mm; para gentamicina foram resistente ≤ 12 mm, intermediário entre 13 – 14 mm e sensível ≥ 15 mm; para amicacina foram resistente ≤ 14 mm, intermediário entre 15 – 16 mm e sensível ≥ 17 mm; para quinupristina-dalfopristina foram resistente ≤ 15 mm, intermediário entre 16 – 18 mm e sensível ≥ 19 mm.

B. Diluição em Agar – "Salt-agar Screening-plate test"

Os testes de Agar diluição foram realizados seguindo normas do NCCLS M7-A5 (NCCLS, 2000c) empregando o meio de cultura Agar Mueller Hinton adicionado de Cloreto de Sódio (4% w/v; 0,68 mol/L) e de oxacilina (Sigma® Aldrich) (6,0 µg/mL) (MHoxa). A partir das colônias, isoladas em meio de AS, foram realizadas suspensões diretas destas colônias em tubos contendo caldo BHI até obter uma suspensão equivalente ao tubo 0,5 de MacFarland; com o auxílio de uma zaragatoa estéril o meio de cultura MHoxa foi inoculado com a suspensão e incubado em estufa 35ºC por 24 h. O crescimento de 1 ou mais colônias determinou um teste positivo e culturas negativas foram confirmadas com uma incubação adicional de mais 24 h (total de 48 h) para comprovação da ausência de crescimento no meio de cultura.

C. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizadas fitas impregnada com gradiente exponencial de drogas (Etest®), através das quais foram determinados os padrões de susceptibilidade. As drogas utilizadas neste teste foram oxacilina 0,002-32 µg/mL, vancomicina 0,016-256 µg/mL e teicoplanina 0,016-256 µg/mL. O procedimento do preparo das placas para este teste foi igual ao realizado para o teste de disco difusão, sendo estes os mesmos preconizados como procedimentos

adequados a serem realizados seguindo instruções do fabricante (AB-Biodisk, 2000). Os resultados foram quantificados em μg/mL e os valores de interpretação para isolados sensíveis, intermediárias ou resistentes foram interpretados segundo documento NCCLS M100-S10 (M7) (NCCLS, 2000c), onde os valores de interpretação para oxacilina foram ≥ 0,5 μg/mL para resistente e ≤ 0,25 μg/mL para sensível; para vancomicina ≥ 32 μg/mL para resistente, 8 – 16 μg/mL para intermediário e ≤ 4 μg/mL para sensível; para teicoplanina ≥ 32 μg/mL para resistente, 16 μg/mL para intermediário e ≤ 8 μg/mL para sensível.

D. Caracterização dos isolados "borderline" oxacilina resistentes

Para a caracterização da resistência "borderline" os isolados que apresentaram-se resistentes a oxacilina e com reação da PCR negativa para o gene *mec*A foram realizados testes de susceptibilidade a amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 μg) e testes de produção de β-lactamases por nitrocefin. O teste de susceptibilidade a amoxicilina-ácido clavulânico foi realizado segundo a metodologia empregada nos testes de DD (item 3.1.1.1 A). O resultado foi interpretado como sensível quando o halo de inibição formado foi ≥ 20 mm. O teste de produção de β-lactamases foi realizado empregando o teste de nitrocefin (Becton Dickinson) segundo instruções do fabricante, sendo que o disco constituído de uma cefalosporina cromogênica foi umedecido com água destilada estéril, em seguida foi aplicado sobre a superfície deste algumas colônias do isolado em estudo, empregando para tanto palitos de madeira. A reação positiva foi interpretada através da visualização de uma cor vermelho cereja, em média 5 min, no local onde foi aplicado o microrganismo. Reações negativas foram observadas até 60 min, seguindo instruções do fabricante, onde não ocorreu alteração na cor original do disco (bege clara).

3.4.1.2- Estudo do potencial de aderência dos isolados

A produção de biofilme responsável pela aderência foi determinada seguindo instruções segundo Christensen e col (CHRISTENSEN et al., 1982). Para este teste as amostras foram cultivadas em meio de "Tryptic Soy Broth" (TSB), adicionado de glicose (0,25%), procedimento este que visa facilitar ativação do gene *ica*, o qual é o responsável pela produção do biofilme. Um total de 10 colônias de cada amostra de *S. epidermidis*

cultivadas em AS foram transferidas para tubos contendo 5 mL de meio de cultura caldo BHI, incubadas em estufa a 35ºC por 24 h. Após este período as amostras foram centrifugadas por 10 min a 2500 rpm e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de caldo TSB. Os tubos foram incubados a 35ºC por 24 h. As amostras foram novamente centrifugadas e o sedimento foi transferido para tubos cônicos de polietileno (Falcon Plastics) contendo 5 mL de caldo TSB. Os tubos foram incubados em homogeneizador (BioShaker BR 30 LF Taitec) a 35ºC por 48 h. Após este período o caldo de cada amostra foi descartado, sendo que nos isolados produtores de biofilme a bactéria fica aderida a parede do tubo e 1 mL de solução de safranina a 0,1% foi adicionado a cada um destes tubos. O corante ficou em contato com os tubos por 10 minutos. Em seguida o corante foi descartado e os tubos foram analisados em posição invertida. A produção de biofilme foi quantificada em positiva e negativa.

3.4.2- Análise molecular dos isolados

3.4.2.1- Detecção da presença do gene *mec*A

Estudos moleculares foram realizados para detecção do gene *mec*A responsável pela resistência a oxacilina. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada para a determinação da presença do gene *mec*A. A PCR composta de uma reação multiplex foi realizada através da amplificação de fragmentos específicos empregando-se a técnica descrita por Martineau e col (MARTINEAU et al., 1996) onde 1 colônia foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI, incubado a 35ºC por 24 h. Esta suspensão foi ajustada até se obter uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland e, um volume de 2 µL da suspensão bacteriana foi adicionado a 48 µL de uma mistura para PCR a qual continha água destilada estéril grau de pureza 1 (32,95 µL), tampão de PCR (5,0 µL), cloreto de magnésio (2,5 µL), triton X (0,05 µL), dNTP (1,0 µL), iniciador "forward" (1,0 µL), iniciador "reverse" (1,0 µL), iniciador 16S rRNA "forward" (1,0 µL) iniciador 16S rRNA "reverse" (1,0 µL) e Taq polimerase (2,5 µL). A reação da PCR foi composta de desnaturação inicial a 92ºC por 3 min, 30 ciclos compostos de 1 min a 92ºC para desnaturação, 1 min a 60ºC para anelamento e 1 min a

72ºC para extensão. Baseados na seqüência do gene *mec*A de *S. epidermidis* depositada no National Center for Biotechnology Information (NCBI), número de acesso X52592 (RYFFEL et al., 1990), os iniciadores específicos foram desenhados com auxílio de programa computacional DNAMan (Lynon Biosoftware, Vandruid, Quebec, Canadá) e foram sintetizados pela Invitrogen® (Life technology, Carlsbad, Ca). Os iniciadores utilizados para a PCR do gene *mec*A foram "forward" 5'-GCA ATC GCT AAA GAA CTA AGT A-3' e "reverse" 5'-TAG ACG TCA TAT GAA GGT GTG-3'. Todas as amostras de PCR também foram testadas com iniciadores específicos para a região ribossomal 16S RNA específica para *S. epidermidis*, baseado na seqüência depositada no NCBI U02913 (GREISEN et al., 1994), sendo "forward" 5'-GGA GGA AGG TGG GGA TGA C-3' e "reverse" 5'-GGT GTG ACG GGC GGT GTG-3', região esta considerada como controle da reação da PCR e também como de identificação da espécie. Após a amplificação foi adicionado a cada tubo 5,0 µL de tampão "loading" e uma eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5 X, a 80V e 200 mA por 90 min. Um marcador de 100 pb foi utilizado como padrão de peso molecular. O gel foi banhado em brometo de etídio por 30 min e fotografado em luz ultravioleta. Um produto de amplificação contendo 552 pb corresponde ao fragmento de DNA esperado foi considerado como uma reação positiva para o gene *mec*A e, um produto de amplificação de 220 pb foi considerado positivo para a região 16S rRNA do *S. epidermidis*.

3.4.2.2- Seqüenciamento do gene *mec*A

A. Extração do DNA amplificado

Os fragmentos com 552 pb gerados pela PCR foram recortados do gel de agarose, em seguida purificados empregando o Kit GeneClean II (Q-biogene®). Para a extração da agarose e purificação do DNA a massa de DNA com agarose foi determinada e esta foi aproximada para volume; um volume (4,5 X ao determinado para o DNA) de iodeto de sódio foi adicionado juntamente com um volume de TBE modificado (0,5 X ao determinado para o DNA); esta mistura foi mantida em banho-maria 45-55ºC por um minuto, misturando delicadamente para a dissolução da agarose; um volume de

"Glassmilk®" foi adicionado a solução (aproximadamente 5 µL); a solução foi misturada em "vortex" gentilmente, incubada a temperatura ambiente por 5 min, sendo que a mesma foi homogeneizada a cada 2 min; a mistura foi centrifugada a 14.000 g por 5 s e o sobrenadante foi descartado; o sedimento foi lavado por duas vezes com solução "new wash" e novamente centrifugada; o sedimento formado foi seco a 55ºC por aproximadamente 10 min; um volume de água destilada estéril grau de pureza 1 foi adicionada (igual ao volume de "Glassmilk®" adicionado); o material foi suspenso gentilmente, centrifugado a 14.000 g por 30 s e o DNA extraído foi removido em solução aquosa (sobrenadante) no qual encontra-se aproximadamente 80% do DNA inicial.

B. Preparo da amostra para seqüenciamento

As mostras foram preparadas seguindo-se o protocolo para seqüenciamento da Applied Biosistems, reações em tubo, no qual foi preparada uma nova reação de PCR, onde foram adicionados 2,0 µL de Big Dye terminator (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing), 6,0 µL de tampão, 2,0 µL do iniciador, 2,0 µL do DNA purificado e 8,0 µL de água destilada estéril grau de pureza 1. Neste passo, cada iniciador foi adicionado separadamente de forma a se obter fitas simples amplificadas do DNA em estudo.

A reação foi composta por uma desnaturação inicial a 96ºC por 1 min, desnaturação 96ºC por 15s, anelamento 50ºC por 15s e extensão 60ºC por 4 min, completando um total de 30 ciclos. Após esta reação, o DNA foi precipitado com etanol e o sedimento formado foi seco e armazenado para o seqüenciamento propriamente dito.

C. Seqüenciamento do gene *mec*A

Para o seqüenciamento, as amostras foram suspensas em Formamida Hi-Di, desnaturadas a 95ºC por 2 min e colocadas em banho de gelo por 1 min. As amostras foram transferidas para a placa (com 96 cavidades), levadas ao seqüenciador ABI Prism® 3100 Genetic Analyser para a reação de seqüenciamento. Cada amostra de DNA foi preparada com um iniciador "forward" e um "reverse", separadamente.

As reações de seqüenciamento foram coletadas e analisadas no programa ABI Prism® Genetic Analyzer Data Collection software versão 1.1, 2002 e Sequencing Analysis versão 3.7, 2001 respectivamente.

As seqüências foram comparadas no NCBI programa BlastN versão 2.2.9, 2004 (ALTSCHUL et al., 1997) para comprovação do produto do seqüenciamento.

3.4.2.3- Análise filogenética do fragmento do gene *mec*A

O estudo filogenético do produto do seqüenciamento correspondente ao gene *mec*A foi realizado empregando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 5.0.9, 2001 (HALL, 1999) para alinhamento, reconhecimento da região de fase aberta de leitura (ORF), tradução para aminoácidos e composição química dos fragmentos. O programa Tree-Puzzle versão 5.0, 2000 foi utilizado para detecção da taxa de transição e transversão e da distribuição gamma. Neste programa também foram detectadas as seqüências homólogas. O programa Paup* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versão 4.0b10 foi utilizado para compor a árvore gênica com modelo de substituição, selecionado através do modeltest, de Tamura Nei (TrN) para parâmetros de máxima Verosimilhança. Nesta análise foi utilizada como grupo externo uma seqüência correspondente ao gene *mec*A de *Staphylococcus sciuri* obtida de NCBI Y13094 (WU et al., 1998), a qual é reconhecida como a proteína ancestral que deu origem ao gene de resistência a oxacilina para *Staphylococcus* spp (WU et al., 1998; CHAMBERS, 1999; COUTO et al., 2003). A árvore gênica formada foi visualizada e editada no programa TreeView versão 1.5.2, 1998.

3.4.2.4- Depósito das seqüências no GenBank

A seqüência de nucleotídeos do gene *mec*A dos isolados analisados foi depositada no GenBank no sitio do (NCBI), a qual pode ser acessada através do endereço http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez.

As seqüências utilizadas na análise filogenética do gene *mec*A também foram depositadas no GenBank, no sitio do NCBI no mesmo endereço citado acima.

3.4.2.5- Análise do grau de similaridade dos isolados por Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Todas as amostras foram submetidas a análise molecular pela técnica de PFGE baseada na técnica descrita por Goering & Dunsing (GOERING e DUNSING, 1990) com modificações. Dez colônias isoladas de *S. epidermidis* cultivados em AS foram transferidas para tubos contendo 20 mL de caldo BHI, estes foram incubados a 35ºC por 24 h com agitação; os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 min a 22ºC, o sedimento foi lavado por duas vezes com solução salina estéril (0,85%); o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de salina estéril e uma alíquota de 20 µL foi transferida para tubos "eppendorf" ao qual foram adicionados 400 µL de tampão EC (Tris 0,006 M, pH 7,5; NaCl 1 M; EDTA 0,1 M; Brij 58 a 0,5 %; Desoxicolato de Sódio 0,2 %; Sarkosyl 0,5 %) e 3,5 µL de Lysostaphin-1.000 U/mL (Sigma® Aldrich); a esta solução foram adicionados 450 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2,0% (low melt agarose a 1 %; Bio Rad Labs. Richmond, Ca); esta solução foi transferida para moldes de PFGE, resfriados a 4ºC por 30 min. Os blocos foram incubados a 37ºC por 5 h, lavados em tampão TE (Tris 0,1 M, pH 7,5; EDTA 0,1 M, pH 7,5), na seqüência foram banhados em solução de ES (EDTA 0,4 M, pH 9,3; Sarkosyl 1 %), para desproteinização, incubados a 50ºC por uma noite. Após lavagens sucessivas com TE os blocos selecionados para a eletroforese foram lavados em solução "Dummy no Salt" para reposição de magnésio. Os blocos contendo o DNA passaram por clivagem com enzima de restrição *Sma*I (Invitrogen®), onde para cada bloco 2,0 µL de enzima e 20,0 µL de tampão foram utilizados.

A eletroforese foi realizada empregando gel de agarose a 1%, ultra-pura de grau cromossômico (Bio Rad Labs. Richmond, Ca.) em tampão TBE 0,5X (Trisma base; Ácido Bórico; EDTA 0,5 M, pH 8,0), com os parâmetros de corrida de 20 horas a 6 Volts/cm a temperatura de 14ºC em aparelho CHEF-DR III (Contour-clamped homogenous electric field; Bio Rad Labs. Richmond, Ca.), com tempo de ciclos de 5s e 35s inicial e final

respectivamente. Um fragmento de gel contendo DNA Lambda foi utilizado como marcador de peso molecular (DNA Lambda concatemer; Bio Rad Labs. Richmond, Ca.). O gel foi banhado em brometo de etídio por 30 a 45 min e revelado sobre luz ultravioleta.

As relações de similaridade dos perfis genotípicos por PFGE foram analisadas através de sistema de imagens (Bio-Capt MW, version 99; M&S Instruments Trading Inc.). O dendrograma gerado pelos perfis moleculares foi analisado segundo o coeficiente de Dice (Ni and Lee), considerando 95% de confiança (Biogene® software, Vilbert-Loumart, France). Para a interpretação dos isolados geneticamente relacionados também foram utilizados os critérios descritos por Tenover (TENOVER et al., 1995) para tipagem molecular por PFGE onde dois isolados foram considerados geneticamente idênticos quando os padrões de fragmentos de DNA revelados pela PFGE estavam presentes em ambos e os isolados apresentaram o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular.

A interpretação epidemiológica desses resultados permitiu concluir que os isolados eram considerados como derivados de um mesmo isolado; um isolado foi considerado como muito relacionado aos outros isolados quando o seu padrão de PFGE diferiu do padrão dos outros isolados em duas ou três bandas; um isolado foi considerado possivelmente relacionado aos outros isolados quando as modificações consistiram de até dois eventos genéticos independentes, fato este que pode gerar diferenças de 4 a 6 bandas; um isolado foi considerado não relacionado aos outros isolados quando os outros isolados e o padrão de PFGE diferiram uns dos outros por mudanças consistentes de três ou mais eventos genéticos independentes gerando sete ou mais bandas diferentes do padrão dos isolados estudados.

3.5- Controle de qualidade

Para o controle de qualidade das reações e procedimentos (NCCLS, 2000b) foram utilizadas Linhagens Padrão provenientes da Coleção de Cultura Tropical, sendo *Staphylococcus epidermidis* (Winslow & Winslow) Evans, (CCT 2581), que corresponde a

Linhagem Padrão da American Type Culture Collection (ATCC 14990) e *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus* Rosenbach, (CCT 1485) que corresponde a Linhagem Padrão da American Type Culture Collection (ATCC 25923).

Para o controle de qualidade do meio de cultura Agar Mueller Hinton (NCCLS, 2000b) foi utilizada a Linhagem Padrão de *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) ATCC 29212 (Cefar diagnostics).

3.6- Análise dos dados epidemiológicos dos pacientes com bacteremia por *S. epidermidis*

O estudo epidemiológico de 85 pacientes foi realizado, retrospectivamente, com o levantamento dos dados nos prontuários e a situação de infecção de corrente sangüínea foi caracterizada pela sepse microbiologicamente comprovada, com pelo menos duas hemoculturas positivas para *S. epidermidis* colhidas em momentos diferentes. O primeiro episódio de infecção para cada paciente foi incluído, uma vez que sete pacientes tiveram mais de um episódio descrito. Para fins epidemiológicos somente o primeiro episódio de infecção de cada paciente foi computado. Na análise epidemiológica os pacientes foram divididos em dois grupos: 1) Pacientes tratados para bacteremia/sepse por *S. epidermidis* e 2) Pacientes não tratados. A indicação do tratamento foi avaliada no prontuário e determinada pelo médico assistente.

As variáveis analisadas foram idade, sexo, unidade de internação e a presença das seguintes variáveis, até um máximo de 30 dias, antes do episódio da infecção de corrente sangüínea por *S. epidermidis*: internação prévia, uso prévio de antifúngicos, uso prévio de antimicrobianos, uso prévio de corticóides, neutropenia, uso de cateter central, uso de cateter de longa duração, uso de sonda vesical de demora, diálise peritoneal, uso de alimentação parenteral, ventilação mecânica, quimioterapia, hemodiálise, cirurgia prévia, transfusão de hemoderivados.

As unidades clínicas a que pertenciam os pacientes foram agrupadas da seguinte forma, clínica cirúrgica (cirurgia geral, gastrocirurgia, neurocirurgia, vascular), clínica médica (dermatologia, enfermaria geral de adultos, medicina interna, moléstias infecciosas, nefrologia, neurologia, reumatologia), emergência clínica (emergência de

trauma, pronto-socorro adulto, unidade de terapia intensiva adulto), hematologia/TMO (unidade de hematologia e transplante de medula óssea), UTI neonatal (unidade de terapia intensiva neonatal do CAISM), pediatria/UTI pediátrica (pediatria e unidade de terapia intensiva pediátrica do hospital das clínicas).

A condição de óbito, devido à ICS causada por *S. epidermidis*, ou por outros motivos foi analisada nos dados do atestado de óbito contido no prontuário do paciente.

Para a análise dos dados dos pacientes e dos dados laboratoriais dos isolados analisados foram construídos questionários no programa Epi Info versão 2002 (CDC Epi Info, 2002).

Através destes dados foram realizadas análises de regressão logística univariada e multivariada dicotômica para estudar a combinação dos fatores de risco que melhor discriminariam os grupos tratados e não tratados como infecção empregando o programa Statitical Analysis System (SAS System for Windows) versão 6.12, 1996.

3.7- Análise estatística dos dados microbiológicos e epidemiológicos

Foram descritas as variáveis do estudo laboratorial dos 100 isolados de *S. epidermidis* provenientes dos 85 pacientes com hemocultura positiva em função do tratamento, sendo considerados os dois grupos distintos, se tratados e não tratados como infecção. Os pacientes foram divididos nos dois grupos para verificar se existiram diferenças estatisticamente significantes quanto a ICS causada por *S. epidermidis*.

Foram analisados os dados sócio-demográficos, dados da internação, dados laboratoriais, dados clínicos, uso de medicamentos e fatores de risco. Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo foram feitas tabelas de freqüências das variáveis categóricas e estatísticas descritivas das variáveis contínuas.

Para comparar as variáveis categóricas entre os grupos foram utilizados o teste de Qui-quadrado e quando necessário o teste exato de Fisher. Para comparar as variáveis contínuas entre os dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O programa

computacional utilizado foi o SAS (SAS System for Windows) versão 6.12, 1996. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0,05$) e as variáveis significantes foram analisadas e comparadas através da análise de regressão logística múltipla (univariada e multivariada) com critério de Stepwise de seleção de variáveis.

4- RESULTADOS

4.1- Análise fenotípica dos isolados

Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

A resistência a oxacilina foi detectada em 82 das 100 isolados estudados. Os testes de disco difusão, concentração inibitória mínima e diluição em Agar apresentaram resultados concordantes.

Nos testes de susceptibilidade a vancomicina, 99 isolados foram sensíveis, um isolado foi intermediário apresentando um valor de CIM de 8,0 µg/mL, o qual foi sensível pelo método de DD. Isolados resistentes não foram detectados.

Para teicoplanina 52 isolados foram sensíveis, 35 isolados foram intermediários e 13 isolados foram resistentes quando avaliadas pelo método de CIM. No teste de DD 87 isolados foram sensíveis, 13 isolados foram intermediários e isolados resistentes não foram detectados por este método.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos podem ser verificados na Tabela 1 onde os dados foram agrupados de forma a analisar os grupos de pacientes tratados e não tratados como infecção.

Tabela 1- Resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados de *S. epidermidis* provenientes das hemoculturas dos pacientes tratados e não tratados como infecção.

Antimicrobiano	***Tratados n = 40***			***Não tratados n = 45***		
	R	I	S	R	I	S
Amicacina	14(35%)	6(15%)	20(50%)	16(35,6%)	4(8,9%)	25(55,6%)
Ciprofloxacina	25(62,5%)	0	15(37,5%)	30(66,7%)	1(2,2%)	14(31,1%)
Gentamicina	25(62,5%)	-	15(37,5%)	25(55,6%)	-	20(44,4%)
Quinupristina Dalfopristina	1(2,5%)	-	39(97,5%)	0	-	45(100%)
Rifampicina	7(17,5%)	-	33(82,5%)	15(33,3%)	-	30(66,7%)
Oxacilina	32(80%)	-	8(20%)	36(80%)	-	9(20%)
Teicoplanina	4(10%)	13(32,5%)	23(57,5%)	8(17,8%)	16(35,6%)	21(46,7%)
Vancomicina	0	0	40(100%)	0	1(2,2%)	44(97,8%)

Valores de interpretação para Amicacina; Ciprofloxacina; Gentamicina; Rifampicina; Quinupristina/Dalfopristina segundo NCCLS M100-S10. Oxacilina; Teicoplanina; Vancomicina segundo NCCLS M2-A7 (M7) e AB-Biodisk, 2000. R, resistente; I, intermediário; S, sensível.

Produção de biofilme

A produção de biofilme (Figura 2) pela técnica empregada foi detectada em 21 isolados, sendo 10 isolados pertencentes ao grupo dos pacientes tratados e 11 isolados ao grupo de pacientes não tratados como infecção (Tabela 2).

Os isolados produtores de biofilme foram predominantes no perfil molecular "C" (23,8%).

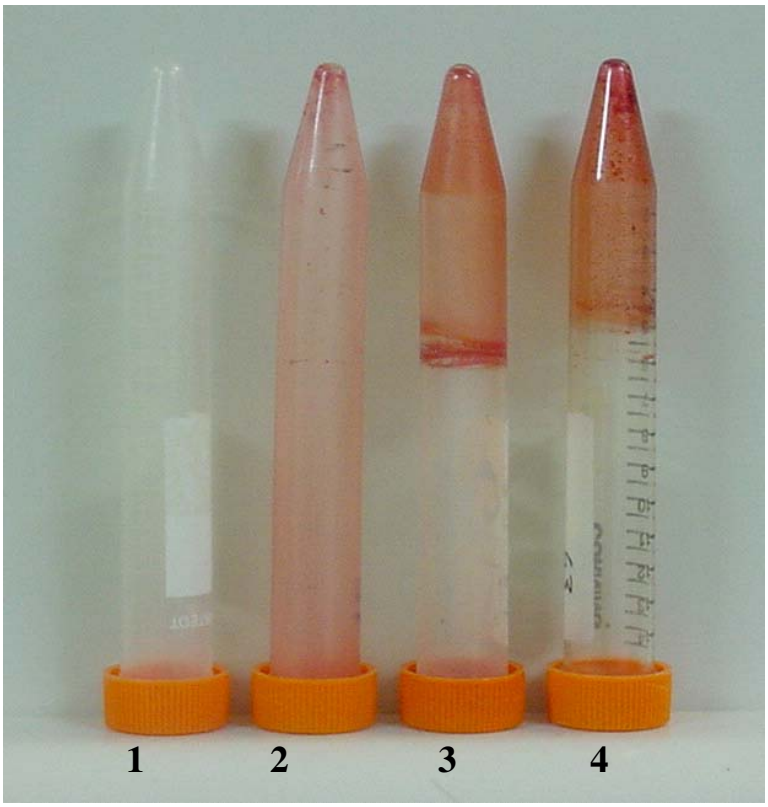


Figura 2- Teste da produção de biofilme reação em tubos segundo técnica de Christensen e colaboradores. Tubo 1, não inoculado; tubo 2, amostra negativa; tubos 3 e 4 amostras positivas.

Tabela 2- Dados da produção de biofilme dos isolados estudados nos dois grupos distintos.

Variável	*Tratados n = 40*		*Não tratados n = 45*	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Produção de Biofilme	10(25%)	30(75%)	11(24,4%)	34(75,6%)

4.2- Análise molecular dos isolados

A detecção do gene *mec*A por PCR

Das 82 amostras resistentes a oxacilina, 78 (95,12%) apresentaram reação de PCR positiva para o gene *mec*A, apresentando um produto da reação com 552 pb correspondentes ao fragmento esperado (Figura 3).

Quatro isolados apresentaram fenótipo de resistência a oxacilina com ausência do gene *mec*A. Dois isolados (isolados 18 e 57) apresentaram hiperprodução de β-lactamases, caracterizados laboratorialmente por resistência a oxacilina de baixo nível, sensibilidade a amoxicilina-ácido clavulânico, teste de produção de β-lactamases (Nitrocefin) positivo (Tabela 4) e nos outros dois isolados (isolados 60 e 95) o mecanismo de resistência a oxacilina não foi caracterizado.

Uma banda de DNA contendo 220 pb correspondeu a reação positiva para a região 16S rRNA de *S. epidermidis* e esta foi detectada em todas as reações de PCR.

Tabela 3- Dados da detecção do gene *mec*A dos isolados estudados nos dois grupos distintos.

Variável	*Tratados n = 40*		*Não tratados n = 45*	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Gene *mec*A	30(75%)	10(25%)	35(77,8%)	10(22,2%)

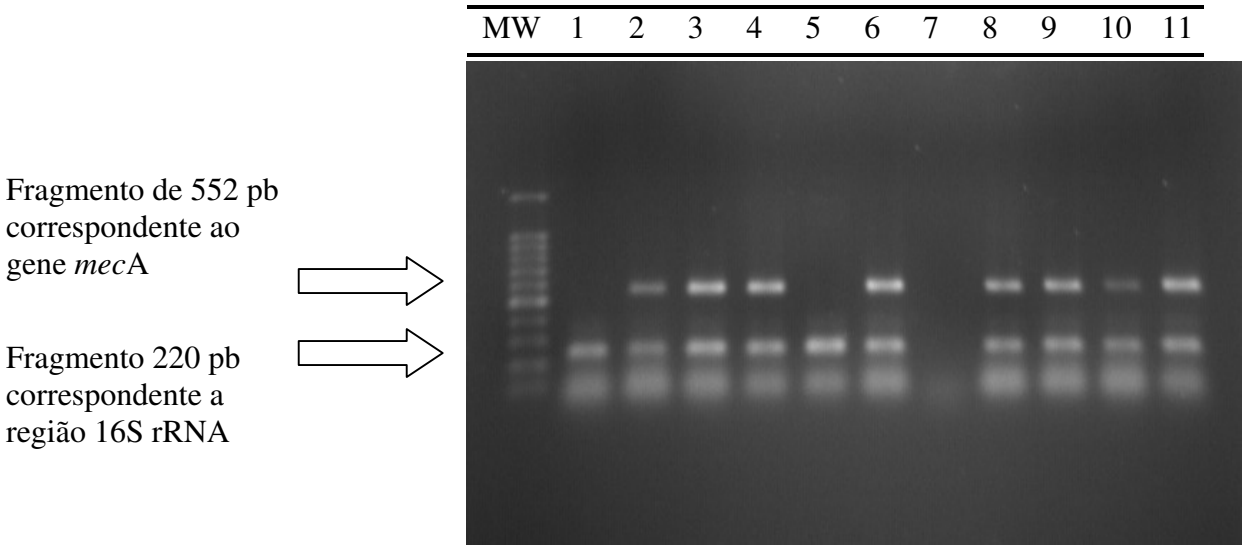


Figura 3- Fotografia do gel da eletroforese do produto da PCR para detecção do gene *mec*A para os isolados estudados. MW Marcador de peso molecular de 100 pb; linhas 1 e 5 isolados com reação de PCR negativa para o gene *mec*A; linhas 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 e 11 isolados com reação de PCR positiva para o gene *mec*A; linha 7 controle da reação de PCR.

Tabela 4- Caracterização dos quatro isolados de *S. epidermidis* oxacilina resistentes que apresentaram reação do gene *mec*A negativa através da reação de PCR.

Isolado No.	***CIM oxacilina (μg/mL)***	***Disco Difusão para amoxicilina-ácido clavulânico[a] (mm)***	***Teste de β-lactamase por Nitrocefin***
18	0,5	40	Pos
57	1,0	26	Pos
60	> 256	38	Neg
95	> 256	35	Neg

[a] Isolados foram consideradas como hiperprodutores de β-lactamases quando (i) o diâmetro do halo de inibição do disco de amoxicilina-ácido clavulânico foi > 20 mm, (ii) a resistência a oxacilina foi de baixo nível e (iii) o teste de nitrocefin produziu uma reação positiva.

O seqüenciamento do gene *mec*A

As 78 amostras analisadas que apresentaram produto de reação de PCR positivas para o gene *mec*A, foram seqüenciadas e uma seqüência de aproximadamente 530 pb foi obtida. A análise destas seqüências no NCBI BlastN demonstraram índices de similaridade da ordem de 85 a 99 %, correspondendo ao gene *mec*A, em *Staphylococcus* spp.

A seqüência de nucleotídeos do gene *mec*A dos isolados analisados foi depositado no GenBank no sitio do NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez e pode ser visualizada com o número AY929067, e também no Anexo 3 (página 128).

A seqüência de aminoácidos traduzida a partir da seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA do gene *mec*A estudado foi analisada através do programa BioEdit e pode ser visualizada no Anexo 4 (página 129).

Analise filogenética do fragmento do gene *mec*A

Com o alinhamento das seqüências foram reconhecidas as regiões extremamente conservadas bem como foram verificadas as similaridades dos aminoácidos constituintes. O tamanho das seqüências foi ajustado para 472 pb, neste caso compreendendo uma fase aberta de leitura completa. Com o programa Tree-Puzzle foram reconhecidos grupos distintos de seqüências no universo estudado.

Nesta análise o grupo 2 compreende 50 isolados, o grupo 3 com 11 isolados, o grupo 4 com 13 isolados e o grupo 5 com 4 isolados. A árvore gênica formada pode ser observada na Figura 4.

As seqüências utilizadas na análise filogenética também foram depositadas no GenBank no sitio do NCBI e podem ser acessadas com os seguintes números: AY952297 (Grupo 2), AY922298 (Grupo 3), AY952299 (Grupo 4) e AY952300 (Grupo 5), e também no Anexo 5 (página 130).

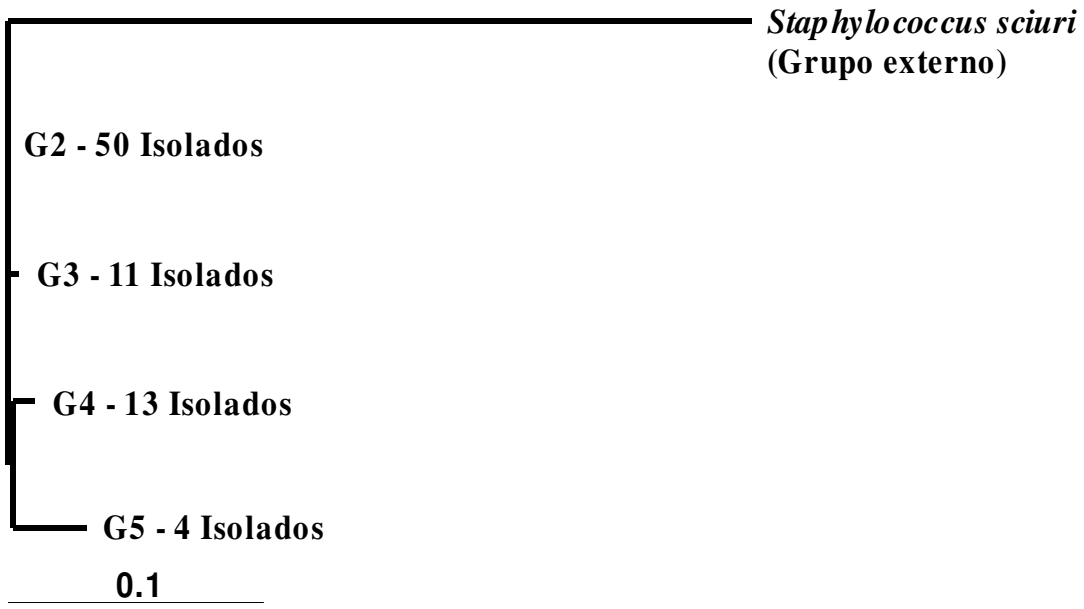


Figura 4- Árvore gênica baseada na seqüência de nucleotídeos do gene *mec*A. O programa Paup* foi utilizado para a construção da árvore empregando o modelo de substituição segundo Tamura Nei (TrN determinado através do modeltest versão 3.06, 2000) para parâmetros de máxima Verossimilhança (–lnL 1153.5603). A seqüência do gene *mec*A de *Staphylococcus sciuri* NCBI Y3094 (WU et al., 1998) foi utilizada como grupo externo.

Tipagem molecular dos isolados

Através da técnica de PFGE foi possível realizar a tipagem dos isolados, os quais foram agrupados em diferentes perfis moleculares. Através da análise dos perfis verificou-se que houve o predomínio do perfil molecular A.

Os isolados foram agrupados em 28 perfis moleculares, onde os perfis com maior número de isolados relacionadas foram, A com 21 isolados, B com 13 isolados, C com 18 isolados, D com 7 isolados. Dezesseis isolados apresentaram perfis moleculares únicos e distintos. A fotografia do gel da eletroforese, juntamente com o dendrograma formado pode ser visualizada na Figura 5.

A distribuição dos 100 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes estudados pode ser observada na Figura 6.

O isolado vancomicina intermediário e teicoplanina resistente apresentou perfil molecular único nas relações de similaridade com os outros isolados estudados.

Os isolados teicoplanina resistentes demonstraram-se como isolados relacionados, onde dos 13 isolados encontrados, 3 isolados pertenciam ao perfil molecular C e outros 2 isolados pertenciam ao perfil molecular B. Os demais isolados teicoplanina resistentes apresentaram perfis moleculares distintos (Figura 7).

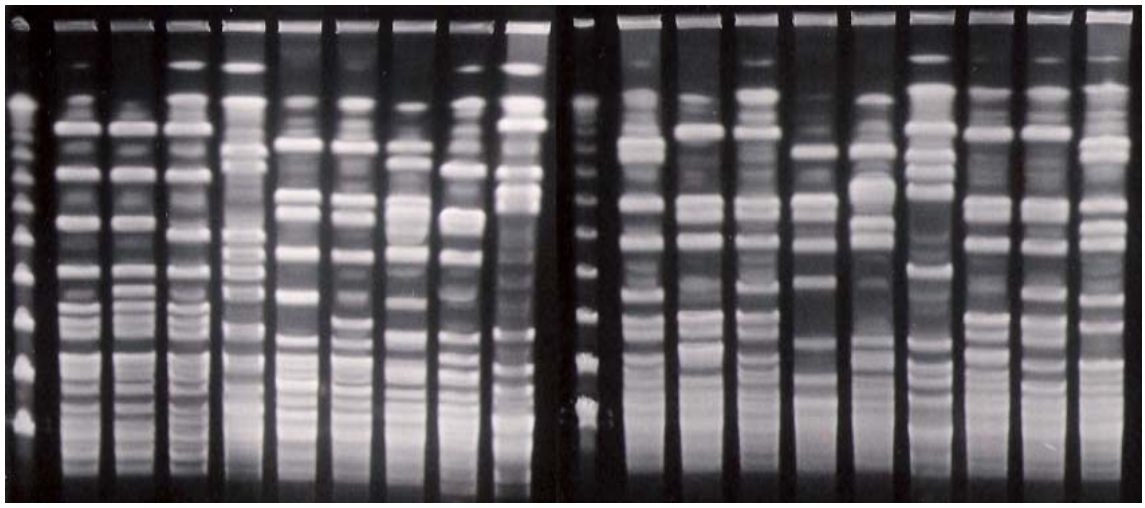
Os perfis moleculares de maior freqüência foram encontrados durante todo o período (Junho de 1999 a Junho de 2001) que compreende este estudo. A distribuição temporal dos isolados pode ser observada na Figura 8.

Na tabela 5 encontra-se a distribuição dos perfis moleculares dos isolados de *S. epidermidis* e a freqüência dos resultados dos testes de susceptibilidade a oxacilina e teicoplanina.

Nas Figuras 9 a 14 encontram-se os diferentes perfis moleculares encontrados distribuídos nas diferentes unidades clínicas estudadas.

A

λ A A' A" B C C' D E F λ G H H' I J K L L' 14



B

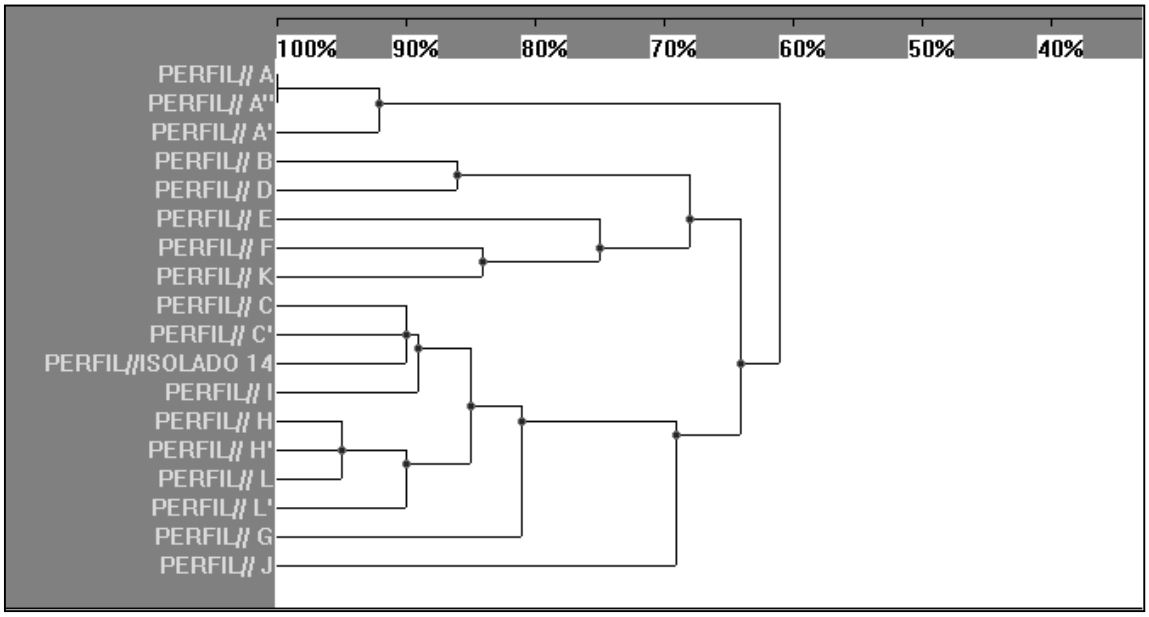


Figura 5- PFGE demonstrando os perfis moleculares dos isolados de *S. epidermidis*, obtidos através da digestão do DNA com enzima de macrorrestrição *Sma*I. **λ,** marcador de peso molecular. A linha 14 corresponde ao isolado que exibiu susceptibilidade reduzida a vancomicina (CIM = 8,0 µg/mL). A – Fotografia do gel dos perfis encontrados; B – Dendrograma.

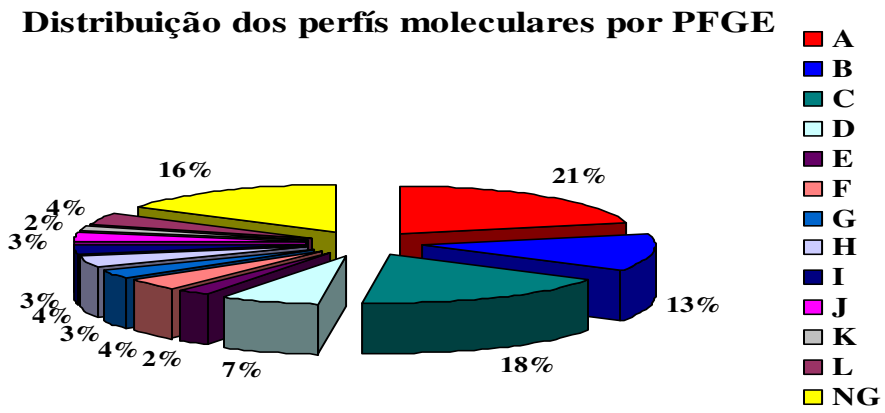


Figura 6- Distribuição dos perfis moleculares dos 100 isolados de *S. epidermidis*.

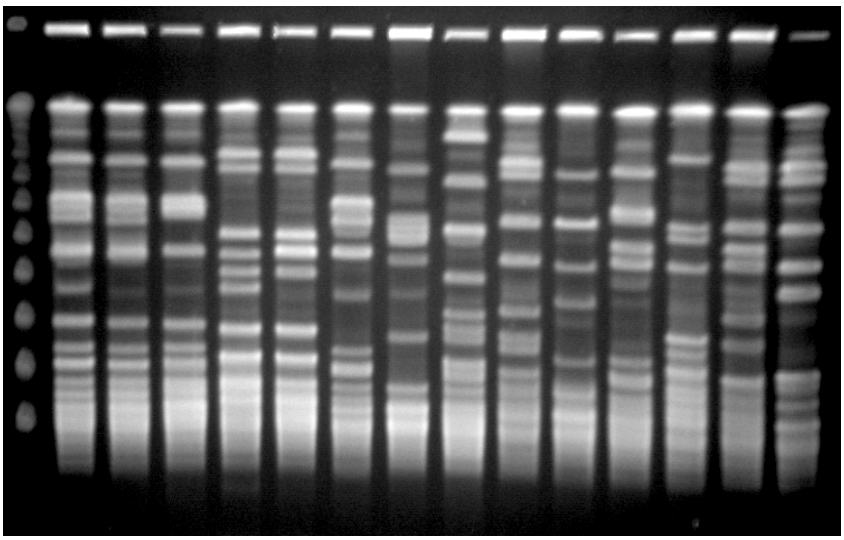
Tabela 5- Distribuição do perfil molecular dos isolados de *S. epidermidis* relacionados com o resultado dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos oxacilina e teicoplanina.

Perfil molecular	***Oxacilina sensível***	***Oxacilina resistente***	***Teicoplanina sensível***	***Teicoplanina intermediária***	***Teicoplanina resistente***
A	1	20	12	8	1
B	2	11	3	8	2
C	2	16	12	6	0
D	0	7	3	1	3
E	0	2	0	1	1
F	2	2	3	1	0
G	1	2	2	0	1
H	1	3	2	2	0
I	0	3	2	0	1
J	1	2	1	1	1
K	1	1	2	0	0
L	0	4	3	0	1
NG	7	9	7	7	2
Total	18	82	52	35	13

NG, Não grupável.

A

λ 25 28 87 3 38 16 47 11 1 7 75 48 14 ATCC



B

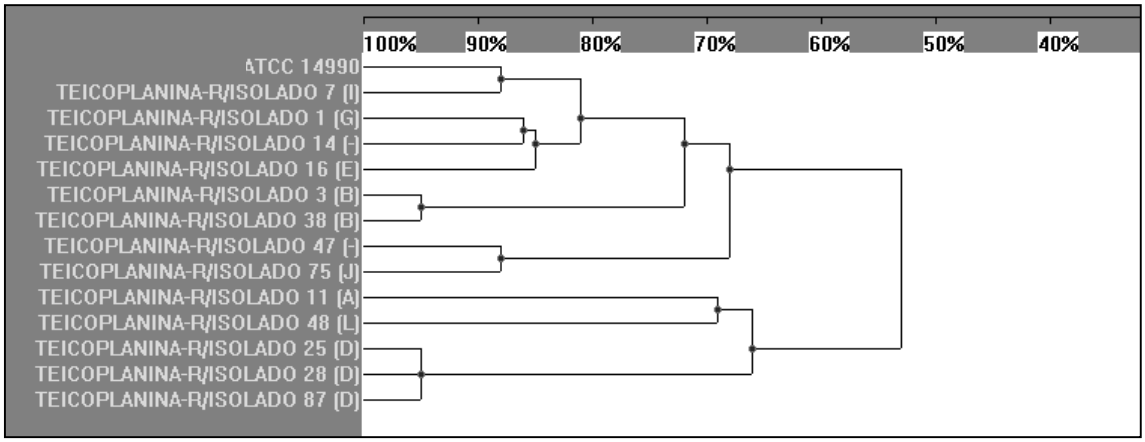


Figura 7- PFGE dos isolados teicoplanina resistentes. DNA de *S. epidermidis* digerido com enzima de macrorrestrição *Sma*I. **λ,** marcador de peso molecular. ATCC 14990 corresponde a cepa padrão de *S. epidermidis*, sendo que esta cepa é teicoplanina sensível. A – Fotografia do gel dos perfis encontrados; B – Dendrograma.

Quadro 2- Demonstração da presença de clones de *S. epidermidis* nas unidades clínicas específicas.

DISTRIBUIÇÃO DOS PERFIS MOLECULARES NAS UNIDADES CLÍNICAS ESTUDADAS

Cirurgia
- D = 1
- C = 1
- F = 1
- H = 1
- J = 1

Clínica Médica
- A = 3
- B = 4
- D = 2
- F = 1
- G = 1
- L = 2
- NG = 3

UTI Neonatal CAISM
- A = 6
- G = 1
- I = 3
- NG = 2

Ped/UTI Pediátrica
- A = 4
- B = 2
- C = 1
- K = 1
- NG = 1

Hemato/TMO
- A = 3
- B = 5
- C = 9
- D = 2
- E = 2
- F = 1
- G = 1
- H = 3
- J = 1
- K = 1
- L = 1
- NG = 7

Emergência
- A = 2
- C = 1
- F = 1
- J = 1
- NG = 2

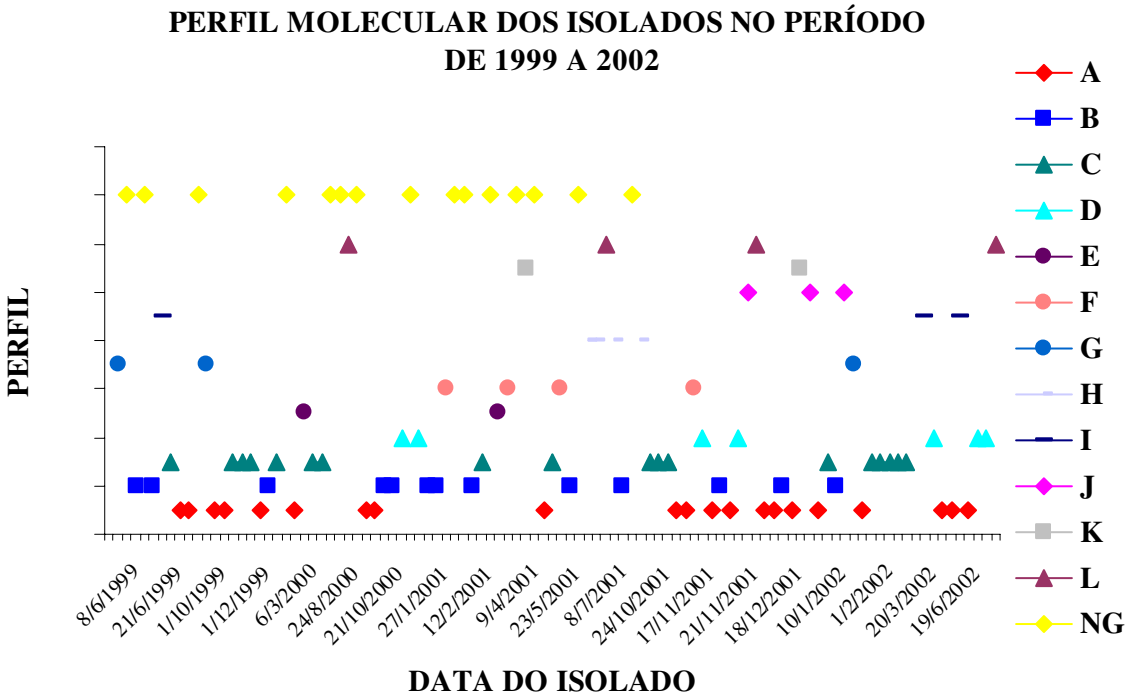


Figura 8- Distribuição temporal dos diferentes perfis moleculares de *S. epidermidis* durante período de 06/1999 a 06/2002. As letras A a L correspondem aos diferentes perfis encontrados; NG se refere aos isolados que apresentaram perfis distintos.

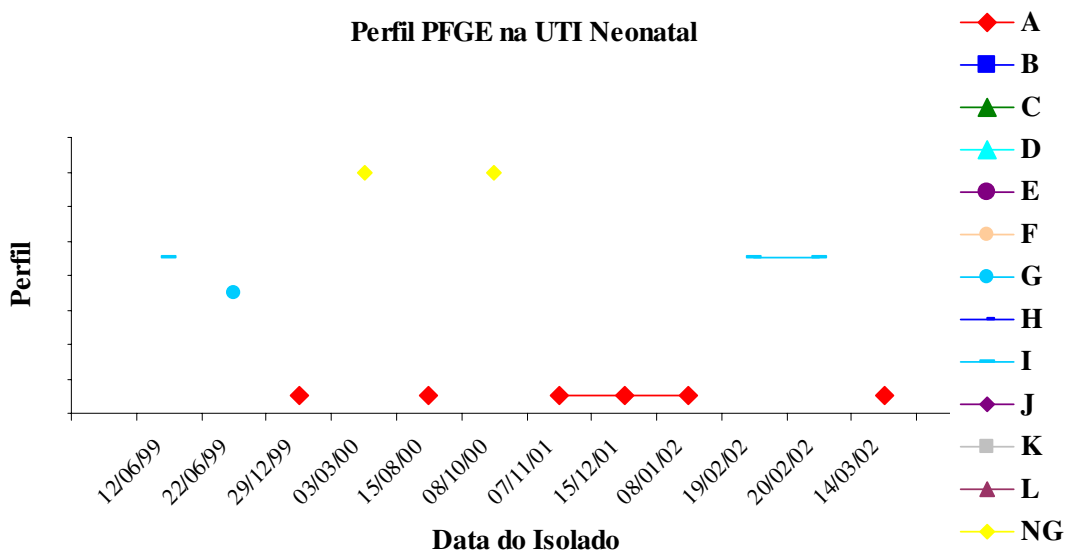


Figura 9- Distribuição dos perfis moleculares dos 12 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da UTI neonatal.

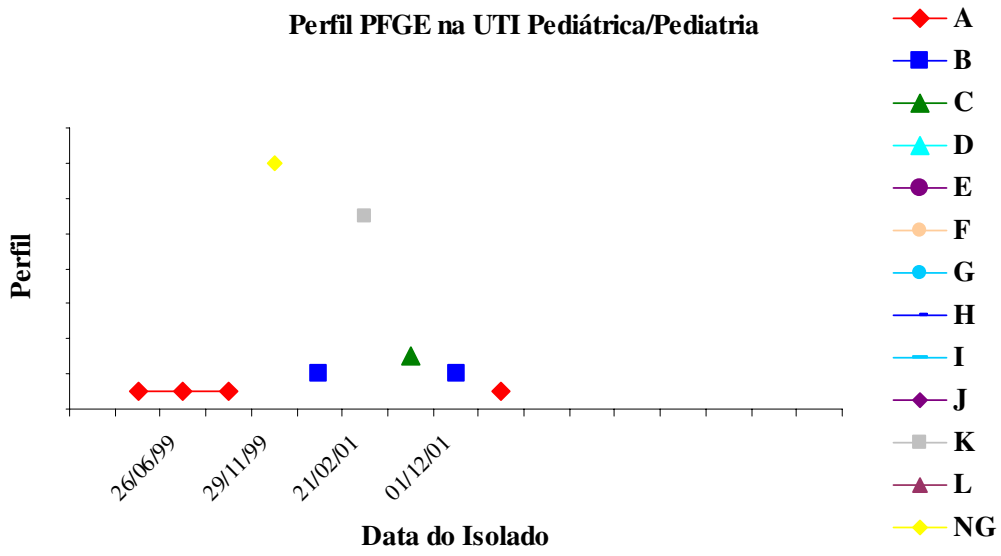


Figura 10- Distribuição dos perfis moleculares dos 9 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da UTI pediátrica/pediatria.

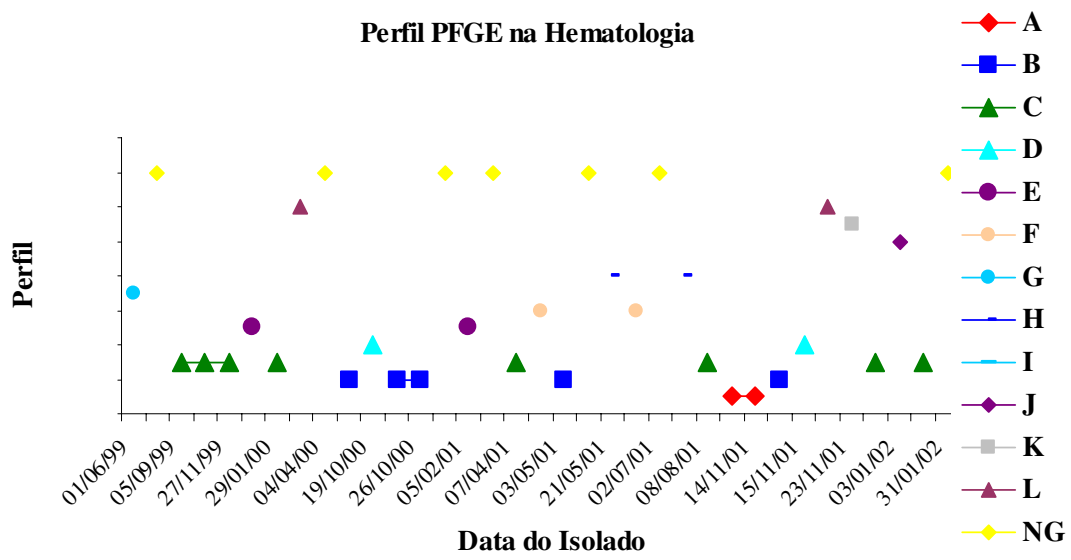


Figura 11- Distribuição dos perfis moleculares dos 36 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da Hematologia.

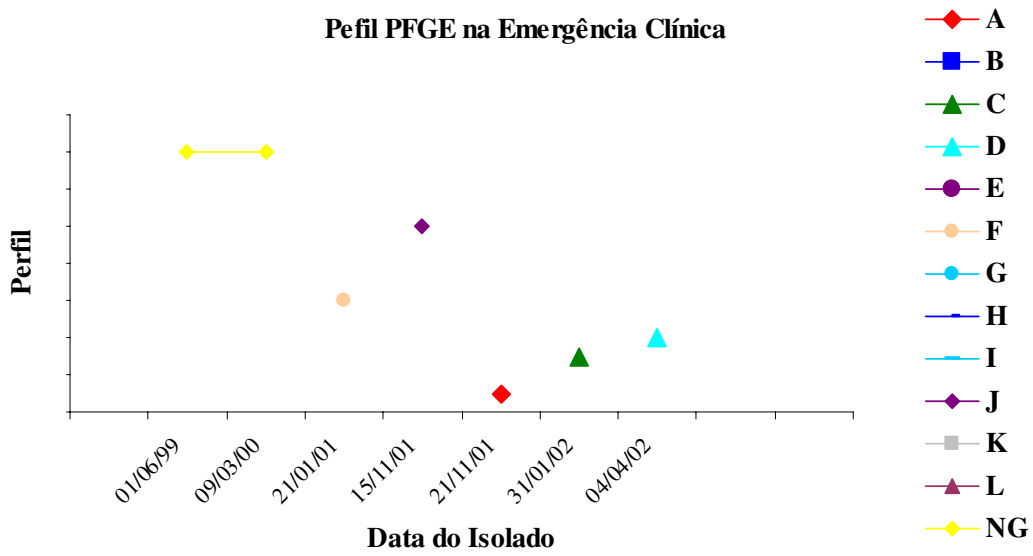


Figura 12- Distribuição dos perfis moleculares dos 7 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da emergência clínica.

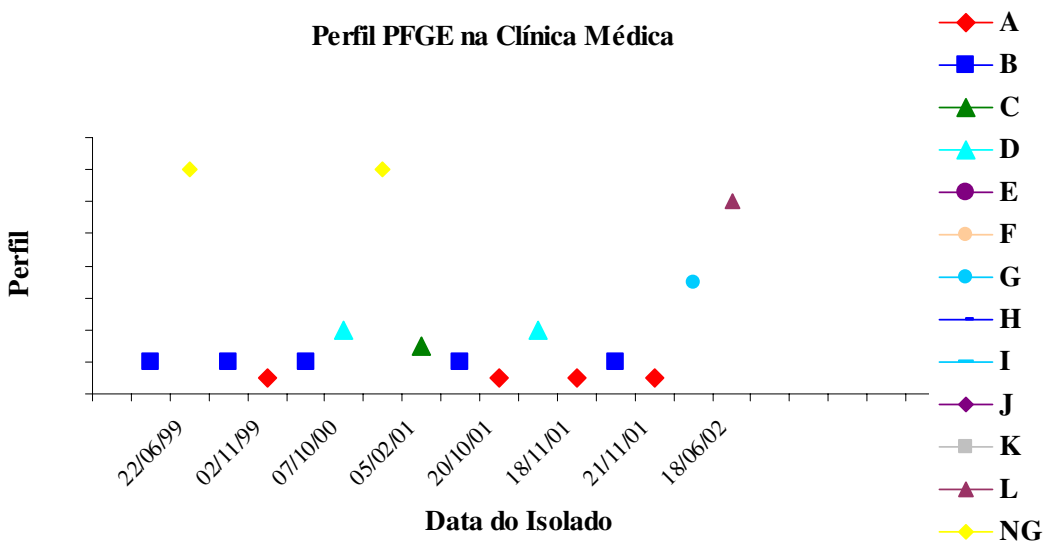


Figura 13- Distribuição dos perfis moleculares dos 16 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da clínica médica.

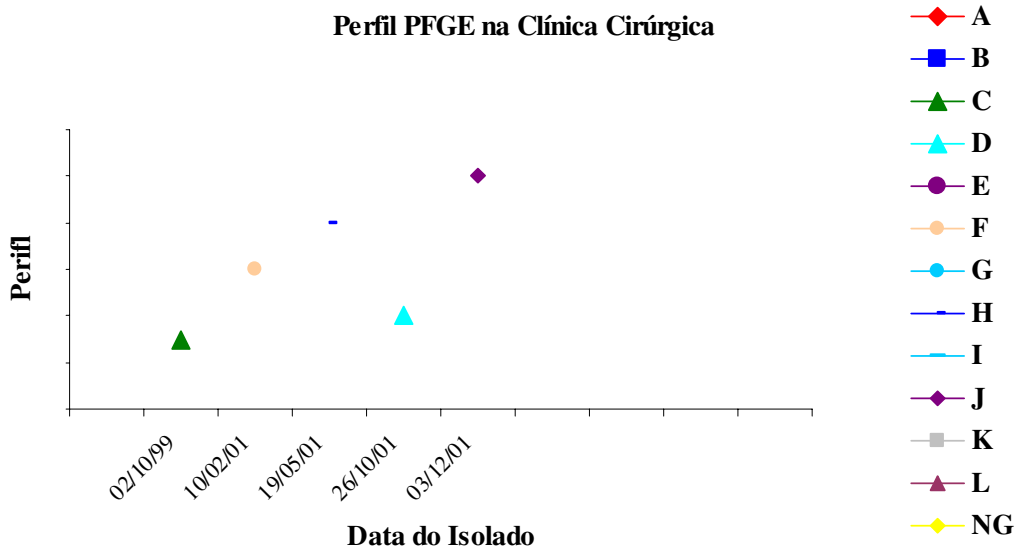


Figura 14- Distribuição dos perfis moleculares dos 5 isolados de *S. epidermidis* provenientes de ICS dos pacientes da clínica cirúrgica.

4.3- Análise epidemiológica dos dados dos pacientes

O grupo de pacientes que tiveram a infecção de corrente sangüínea por *S. epidermidis* e foram tratados como infecção recebendo antibioticoterapia correta foi composto por 40 pacientes. O esquema de tratamento verificado no prontuário foi o seguinte, 21 pacientes foram tratados com vancomicina, 11 pacientes foram tratados com vancomicina e cefepime, 2 pacientes foram tratados com oxacilina, 2 pacientes foram tratados com teicoplanina, 2 pacientes foram tratados com vancomicina e oxacilina, 1 paciente foi tratado com oxacilina e amicacina, 1 paciente foi tratado com cefepime. O tratamento durou em média 10 dias.

O segundo grupo de pacientes que tiveram *S. epidermidis* isolado da corrente sangüínea mas o achado não foi considerado como infecção e sim como colonização ou contaminação foi composto por 45 pacientes.

A distribuição dos pacientes nas diferentes clínicas estudadas pode ser observado na Figura 15.

Através da análise dos prontuários dos pacientes verificou-se que 36 destes pertenciam a Unidade de Hematologia, dentre os quais 21 foram submetidos a transplante de medula óssea, 12 pacientes da Unidade de Terapia Intensiva neonatal, 16 da Clínica médica, 5 da Cirurgia, 7 da Emergência clínica e 9 da UTI Pediátrica/Pediatria.

A descrição das variáveis qualitativas analisadas neste estudo pode ser verificada na Tabela 6 e os fatores de risco envolvidos podem ser verificados no Tabela 7.

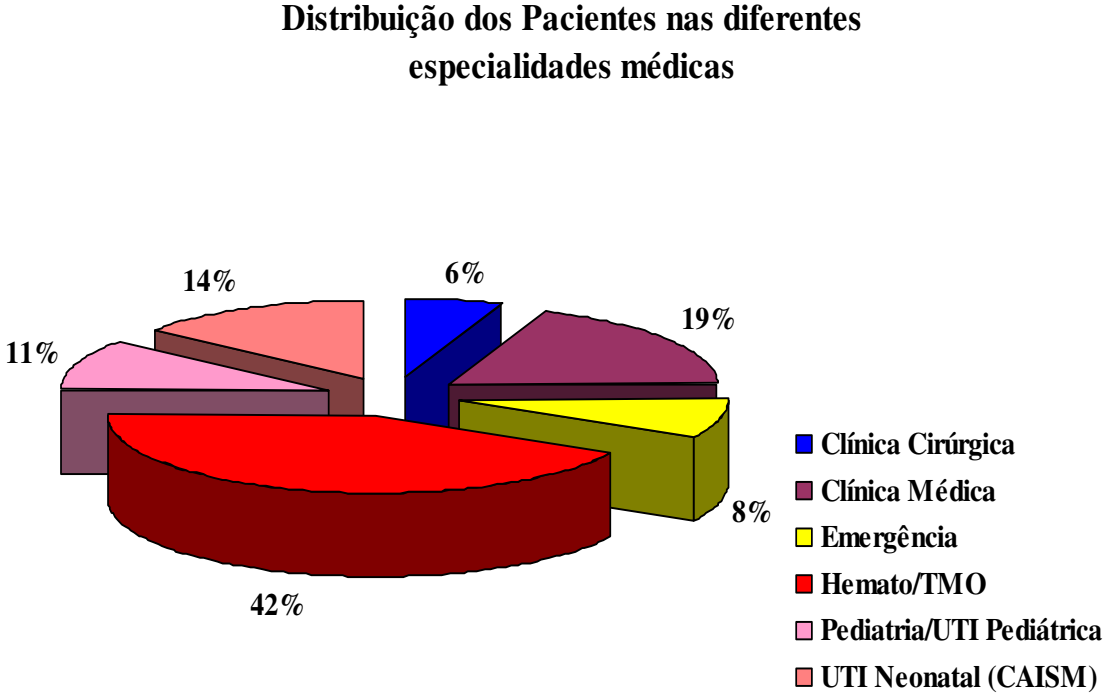


Figura 15- Distribuição gráfica referente à especialidade médica a qual pertenciam os dois grupos de pacientes incluídos nesta análise.

Tabela 6- Descrição das variáveis qualitativas categóricas, variáveis contínuas e estatística descritiva dos dados analisados neste estudo.

Dados		***Tratados n = 40***		***Não Tratados n = 45***		**P *valor***
Sexo		F = 12		F = 16		
		M = 28		M = 29		
Idade		Media	DP	Media	DP	
		28,16	23,50	35,60	22,61	0,127
Tempo Internação		Media	DP	Media	DP	
		36,65	30,83	40,45	39,83	0,744
Unidade de Internação	Cirúrgica	1 (2,5%)		4 (8,9%)		
	Médica	4 (10%)		12 (26,7%)		
	Emergência	1 (2,5%)		6 (13,3%)		
	Hemato/TMO	21 (52,5%)		15 (33,3%)		
	Pediatria/UTI	2 (5,0%)		7 (15,6%)		
	UTI Neonatal	11 (27,5%)		1 (2,2%)		
Diagnóstico Primário	Cardio-Respiratório	10 (25,0%)		4 (8,9%)		
	Colagenoses	0		2 (4,4%)		
	Hematológico	21 (52,5%)		15 (33,3%)		
	Hepato-Gastrológico	4 (10,0%)		8 (17,8%)		
	Infecção	0		7 (15,6%)		
	Neurologico	1 (2,5%)		4 (8,9%)		
	Outras	4 (10,0%)		5 (11,1%)		

Tabela 7- Fatores de risco analisados para os pacientes distribuídos nos grupos de tratados e não tratados como infecção de corrente sangüínea por *S. epidermidis*.

Variável analisada		*Tratados n = 40*		*Não tratados n = 45*	
		SIM	NÃO	SIM	NÃO
Neutropenia		18(45%)	22(55%)	6(13,3%)	39(86,7%)
Quimioterapia		18(45%)	22(55%)	9(20%)	36(80)
Cirurgia Prévia		18(45%)	22(55%)	13(28,9%)	32(71,1%)
Nutrição Parenteral		16(40%)	24(60%)	17(37,8%)	28(62,2%)
Uso prévio de	Antifúngicos	21(52,5%)	19(47,5%)	15(33,3%)	30(66,7%)
	Antimicrobianos (geral)	33(82,5%)	7(17,5%)	36(80%)	9(20%)
	Vancomicina	3(7,5%)	37(92,5%)	5(11,1%)	40(88,9%)
	Oxacilina	5(12,5%)	35(87,5%)	4(8,9%)	41(91,1%)
	Ciprofloxacina	19(47,5%)	21(52,5%)	14(31,1%)	31(68,9%)

Neste estudo os dados foram estatisticamente significantes para as variáveis neutropenia (P = 0,0020) e para quimioterapia (P = 0,0155). Os resultados da análise de regressão logística podem ser analisados na Tabela 8.

Tabela 8- Análise de regressão logística univariada dicotômica dos fatores de risco na discriminação dos pacientes tratados e os não tratados como infecção.

Variáveis	*Níveis de Comparação*	**P *valor***	***O.R.***	***IC95%O.R.***
	UNIVARIADA			
Uso prévio Antifúngicos	Sim/Não	0,0763	2,21	0,92-5,31
Uso prévio Antimicrobiano	Sim/Não	0,7687	1,18	0,39-3,52
Uso de Ciprofloxacina	Sim/Não	0,1239	2,00	0,83-4,86
Neutropenia	Sim/Não	0,0020	5,32	1,84-15,37
Quimioterapia	Sim/Não	0,0155	3,27	1,25-8,55
Cirurgia prévia	Sim/Não	0,0801	2,25	0,91-5,58
	MULTIVARIADA			
Neutropenia	Sim/Não	0,0024	5,18	1,79-15,00
Quimioterapia	Sim/Não	0,0183	3,18	1,22-8,32

P valor = Nível de significância adotado de 5 % (P < 0,05). OR = Razão de risco para tratados (tratados n = 40; não tratados n = 45). IC95%OR = Intervalo de 95% de confiança para a Razão de Risco. Nível de comparação/nível de referência. Critério de seleção: Stepwise.

No grupo de pacientes tratados como infecção (n = 40), 13 pacientes (32,5%) evoluíram para óbito e, destes, 2 pacientes (5%) foram devido a sepse por *S. epidermidis* e 11 pacientes (27,5%) por outros motivos. Para o grupo de pacientes não tratados como infecção (n = 45), 22 pacientes (48,8%) evoluíram para óbito e em nenhum destes o óbito foi declaradamente devido a sepse por *S. epidermidis*. A taxa de letalidade neste estudo foi de 41,2%. Na tabela 9 pode-se observar a que clínica pertenciam os pacientes que evoluíram para óbito.

Tabela 9- Descrição da especialidade clínica a qual pertenciam os pacientes que evoluíram para óbito no grupo de pacientes tratados e não tratados como infecção.

Especialidade	***Tratados n = 40***	***Não tratados n = 45***
	Óbito	Óbito
Clínica Cirúrgica	0	3
Clínica Médica	3	4
Emergência	0	3
Hemato/TMO	5	8
Pediatria/UTI Pediátrica	1	3
UTI Neonatal (CAISM)	4	1
Total	13	22

5- DISCUSSÃO

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para oxacilina apresentaram resultados bastante concordantes onde, 82 isolados foram resistentes a este antimicrobiano, com prevalência um pouco acima dos verificados na literatura internacional, os quais apresentam 50 a 70% dos isolados resistentes (KRCMERY et al., 1996; LIVERMORE, 2000; VON EIFF et al., 2000; FINKELSTEIN et al., 2002; STEFANI e VARALDO, 2003), dados nacionais relatam 66 a 68 % de isolados resistentes a oxacilina (FERREIRA et al., 2002; CHANG et al., 2003) e dados multicêntricos nacionais informam um total de 87% de resistência para *Staphylococcus* spp coagulase negativos, incluindo aqui os outros estafilococos, causadores de infecções de corrente sangüínea (SADER et al., 2001). Os testes de disco difusão bem como os de diluição em Agar e CIM foram capazes de identificar todos os isolados resistentes a este antimicrobiano, o qual é destacado pela sua grande importância na terapêutica, uma vez que a oxacilina é a primeira escolha e a melhor droga para se tratar infecções por *Staphylococcus* spp (GILBERT et al., 2003).

O teste de diluição em Agar demonstrou ser uma metodologia excelente no estudo de resistência a oxacilina em *S. epidermidis*, sendo considerado na literatura uma metodologia mais sensível que o DD, apresentando fácil execução e interpretação embora o NCCLS não recomende mais este teste (FERREIRA et al., 2002; ROWE et al., 2002).

Os mecanismos de resistência a oxacilina demonstraram-se heterogêneos. Dois isolados apresentam o fenótipo de hiperprodução de β-lactamases, os quais foram identificados somente depois de verificada a ausência do gene *mec*A, sendo destituídos deste gene e, sua resistência a oxacilina foi caracterizada pela produção de quantidades expressivas de β-lactamases, mas os testes de disco difusão, CIM e diluição em Agar foram capazes de detectar esta resistência não usual, embora o mecanismo, denominado de resistência "borderline" (CHAMBERS, 1997; MARTINEAU et al., 2000a; BROWN, 2001; McKINNEY et al., 2001), somente seja esclarecido através do genótipo. Além deste mecanismo, também foi observada a resistência causada por modificação de afinidade a outras PBPs, descritas inicialmente por Tomasz e col (TOMASZ et al., 1991). Segundo relatos da literatura a PBP3 é a principal proteína envolvidos nestes casos de resistência (PETINAKI et al., 2001). Em *S. aureus* o mecanismo envolvido é uma PBP4 com mutação pontual através de uma transpeptidase adquirida da PBP 2a resultando na resistência a oxacilina (LESKI e TOMASZ, 2005).

O fenótipo "borderline" descrito inicialmente por McDougal e Thornsberry (McDOUGAL e THORNSBERRY, 1986) já era reconhecido como causador de resistência "in-vitro" para *Staphylococcus* spp desprovidos do gene *mec*A, mas não diretamente associado a falha terapêutica. A resistência clássica à oxacilina está diretamente relacionada a alterações da PBP 2a, onde os isolados possuem o gene *mec*A expresso. A transferência horizontal deste gene em clones de *Staphylococcus* spp coagulase negativos (JACOBY e ARCHER, 1991) e, principalmente em *S. aureus* (KREISWIRTH et al., 1993; WIELDERS et al., 2001) resultaram na disseminação mundial de clones oxacilina resistentes.

Embora existam relatos dos modelos de resistência a oxacilina não usuais, sejam eles através do fenótipo "borderline" ou de alterações de outras PBPs, a prevalência destas resistências não são informadas. No caso deste estudo, 4,8% dos isolados foram resistentes a oxacilina através destes mecanismos de resistência não usuais.

Para vancomicina os testes de susceptibilidade foram discordantes apenas em um isolado, o qual apresentou-se sensível no teste de disco difusão e com valor intermediário no teste de CIM (8,0 μg/mL). Atualmente, devido a resistência emergente de *Staphylococcus* spp a glicopeptideos, principalmente nos isolados coagulase negativos (CDC - MMWR, 1997; CDC - MMWR, 2002) é de extrema importância a detecção correta de isolados com perfil intermediário, uma vez que estes mecanismos de resistência com suas características peculiares podem ser transmitidos a outras amostras, tornando o ambiente hospitalar um importante reservatório de genes de resistência (FERREIRA, 2002). Os isolados glicopeptideos intermediários tem como característica serem resistentes a oxacilina, sendo relatado o seu isolamento em diversas partes do mundo (KLOOS e BANNERMAN, 1994; DEL'ALAMO et al., 1999; LIVERMORE, 2000; BOISSON et al., 2002; TOMASZ, 2003), inclusive no Brasil (NUNES et al., 2002) onde se verificou que a resistência a glicopeptideos é mais freqüente em SCN e que a teicoplanina apresentou maior índice de resistência do que a vancomicina.

O mecanismo da susceptibilidade diminuída a glicopeptídeos está relacionada ao aumento da produção de muropeptídeos não-amidados e a redução da ligação cruzada do peptidoglicano da parede celular, sendo que este mecanismo promove o aumento da ligação

da vancomicina à parede celular, reduzindo a quantidade deste antimicrobiano que atingiria o alvo na membrana citoplasmática (KOMATSUZAWA et al., 2002; CUI et al., 2003).

Nos testes de susceptibilidade a teicoplanina, os resultados foram bastante discordantes. O método de disco difusão não foi capaz de detectar isolados resistentes, dos quais 13 apresentaram CIM elevado, sendo caracterizados como teicoplanina resistentes. Com sensibilidade diminuída, ou seja, resistência intermediária foram observados 35 isolados, e um total de 52 isolados foram sensíveis. Dados nacionais (NUNES et al., 2002) também demonstram essas discordâncias no estudo de susceptibilidade a teicoplanina quando o teste de DD e um método dilucional é empregado, onde aproximadamente 25% dos SCN apresentam resistência intermediária a este antimicrobiano. Estes dados demonstram que um método dilucional é necessário quando estudamos glicopeptideos, mesmo porque a vancomicina e a teicoplanina, embora sejam análogos, apresentam comportamento diferente nos testes de susceptibilidade (TENOVER et al., 1997; LIVERMORE, 2000, SLOOS, 2000b) e, "in vivo" durante a terapia antimicrobiana com teicoplanina, isolados resistente podem ocorrer (CHAMBERS, 1997). Os isolados resistentes a teicoplanina tem em comum a característica de serem resistentes a uma grande variedade de outros antimicrobianos (TENOVER et al., 1997; DEL'ALAMO et al., 1999; LIVERMORE, 2000). Neste estudo os 13 isolados teicoplanina resistentes também foram resistentes a oxacilina, para os 35 isolados intermediárias 85,7% também foram resistentes a oxacilina, característica esta que estatisticamente parece estar relacionada a resistência a glicopeptideos (TENOVER et al., 2001) ou seja, para que um isolado apresente resistência a um glicopeptideo este, em primeiro lugar, deve ser resistente a oxacilina.

Como os testes foram realizados por DD e por CIM (Etest®) foi possível comparar os dois métodos e a diferença entre eles é altamente significante reforçando e sustentando o dados de que é necessário um método dilucional para aferir a susceptibilidade a teicoplanina nos isolados de *S. epidermidis* (Qui-quadrado 23,00; $P < 0,001$).

Nos isolados estudados, a produção de biofilme foi detectada em 21 isolados, sendo esta substância reconhecida como característica de virulência em *Staphylococcus* spp, conferindo características de alta resistência a tratamentos com antimicrobianos

(DONLAN, 2001). Tem uma elevada importância quando se trabalha com isolados a partir de amostras provenientes de cultura de cateter. Nos casos de isolados de hemoculturas, a porcentagem de isolados produtores de biofilme é menor, sendo introduzidos a partir da pele ou de implantação de cateter, provocando endocardites, podendo chegar a 47% dos casos de infecções de corrente sangüínea, parasitando o tecido ao redor do coração, principalmente em pacientes que foram submetidos a cirurgia cardíaca (SILVA, et al., 2000; DONLAN, 2001). O potencial de patogenicidade de *S. epidermidis* está principalmente relacionado com esta sua capacidade de aderência a superfícies (KENNEDY et al., 2000; GELOSIA et al., 2001; VUONG e OTTO, 2002), formando o biofilme que é capaz de proteger as células deste microrganismo tendo reconhecida, como característica fundamental, a capacidade destes isolados em inibir a proliferação de linfócitos T, produzir interações com a gênese de linfócitos B com conseqüente diminuição da produção de imunoglobulinas, interferindo até mesmo com a fagocitose e a morte intracelular (KLOOS e BANNERMAN, 1994; VUONG e OTTO, 2002).

A análise das seqüências no programa BlastN confirmou que as amostras submetidas tratavam-se de seqüências relacionadas ao gene *mec*A e conseqüentemente a proteína PBP 2a de *S. epidermidis*, apresentando pequenas modificações e porcentagem de similaridade da ordem de 85 a 99%, dependendo da qualidade da seqüência analisada, sem qualquer tipo de modificação ou corte aplicado às mesmas.

Diferente dos testes de BlastN, a análise filogenética das seqüências, após a retirada das extremidades ajustando o alinhamento para 472 pb e, a leitura a partir do ATG inicial, foram reconhecidas 50 seqüências com similaridade total e outras 28 seqüências com pequenas alterações, as quais diferem em termos de inserção ou deleção de bases, embora a atividade da proteína produzida, ou seja, a PBP 2a não tenha perdido a sua característica de resistência a oxacilina. Na análise da árvore gênica podemos observar que o grupo que contem a maioria das seqüências corresponde ao mais adaptado filogeneticamente e que as modificações ocorridas não provocaram a perda da atividade da proteína demonstrando a mínima variabilidade genética e evolução do gene. A grande proximidade entre os grupos caracteriza pouca variabilidade e uma grande estabilidade genética do fragmento mantendo, portanto, as características fenotípicas de resistência a oxacilina.

Até a presente data este trabalho representa o primeiro depósito brasileiro de seqüências de nucleotídeos referentes ao gene *mec*A de *S. epidermidis* no GenBank.

Atualmente estão depositados dois genomas completos de *S. epidermidis*, sendo o primeiro depositado em 2003 com número de acesso NC 004461 (ZHANG et al., 2003) e o segundo depositado em 2005 por um grupo norte americano com número de acesso NC 002976.

A análise de genotipagem dos isolados demonstrou a disseminação clonal de *S. epidermidis* provenientes de hemoculturas. A disseminação geográfica de clones de *S. epidermidis* oxacilina resistentes são detectadas por PFGE, embora este microrganismo seja um microbiota normal da pele, os pacientes hospitalizados são envolvidos em infecções nosocomiais por este agente, os quais muitas vezes são resistentes a múltiplas drogas, muitas vezes implicados em transferência de diversos mecanismos de resistência para *S. aureus* tendo papel fundamental na disseminação desses clones (FERREIRA et al., 2002; MIRAGAIA et al., 2002; NUNES et al., 2005).

As relações de similaridade empregando-se os critérios de Tenover e col (TENOVER et al., 1995) foram capazes de discriminar e agrupar os isolados. A análise através do programa BioGene empregado na construção do dendrograma com coeficiente de DICE foram capazes de distribuir os isolados em diferentes perfis moleculares perfazendo um total de 84 isolados com algum grau de similaridade, distribuídos nos diferentes grupos e 16 isolados com perfil molecular distinto, verificando assim o alto poder discriminatório da técnica de PFGE.

Neste estudo, verificou-se que 42 % dos pacientes que apresentaram hemocultura positiva para *S. epidermidis* eram da unidade de Hematologia deste hospital, 14 % eram da Unidade de neonatologia (CAISM) e 11% eram da unidade de Pediatria/UTI Pediátrica. Pacientes portadores de doenças crônicas, transplantados e recém nascidos de baixo peso são os principais pacientes acometidos por infecções de corrente sangüínea (KREDIET et al., 2001; BOGADO et al., 2002; RAIMUNDO et al., 2002), sendo que nestas unidades também foram observados o predomínio de clones, embora estas sejam unidades distintas.

Dados de prevalência reportam que UTI ocupa o primeiro lugar com 3,15 por 1.000 pacientes dia a incidência de ICS causada por SCN e o segundo lugar é ocupado por unidades de Hematologia com 0,82 por 1.000 pacientes dia das ICS por SCN (BOISSON et al., 2002).

Outra característica importante é o uso prolongado de antibioticoterapia, que neste caso foram 82,8% dos pacientes, bem como o emprego de protocolos que, como nos casos de pacientes com leucemia, fazem uso de antibióticos profiláticos. Nos casos específicos de estudos em neonatologia, um aumento significativo de morbidade e mortalidade são observados. Nestes casos, a disseminação clonal de *S. epidermidis* é acentuada com o predomínio geralmente de um único clone endêmico (SILVA et al., 2001; KREDIET et al., 2001 BOGADO et al., 2002; RAIMUNDO et al., 2002).

Em pacientes de unidades de onco-hematologia também ocorre o predomínio de clones, principalmente em infecções de corrente sangüínea relacionadas a cateteres de longa permanência tais como cateter Hickman (Kennedy et al., 2000), com aproximadamente 6,0 infecções por 1000 cateter/dia (Nouwen et al., 1998). Como exemplo de ações capazes de reduzir o grande número de SCN causadores de ICS associada a CVC temos o uso de cateter impregnado com antimicrobianos (BOISSON et al., 2002), bem como o emprego de procedimentos adequados, seguindo protocolos para a implantação do CVC (LOBO et al., 2005), conseguindo desta forma reduzir o número de infecções o que, por conseqüência, culmina com a diminuição do uso de glicopeptídeos no tratamento de ICS promovendo a sobrevida dos pacientes hospitalizados minimizando os índices de morbimortalidade.

O uso prévio de antibioticoterapia caracteriza-se como um fator de risco para o desenvolvimento de sepse, selecionando microrganismos no ambiente hospitalar através de pressão seletiva resultando no predomínio de clones os quais permanecem no ambiente hospitalar favorecendo a contaminação de diferentes pacientes (KRCMERY et al., 1996; KREDIET et al., 2001). Neste estudo, 10,8 % dos pacientes fizeram uso prévio de oxacilina, 10,8% fizeram uso prévio de vancomicina e 39,8 % fizeram uso prévio de ciprofloxacina. Sabe-se que o uso de antibióticos como a ciprofloxacina tem uma grande importância sobre a microbiota da pele dos pacientes em tratamento, selecionando os

microrganismos e tornando-os resistente a uma grande variedade de drogas, exercendo um alto grau de pressão seletiva (MULDER, et al. 1997; HOIBY et al., 1997, NOUWEN et al., 1998). Um percentual de 68% dos isolados foram resistentes a ciprofloxacina, destes um total de 37 pacientes que fizeram uso prévio deste antimicrobiano e 78,4% tiveram *S. epidermidis* resistentes a ciprofloxacina (Qui-quadrado 6,09; *P* = 0,013; OR 3,57). A bacteremia por *S. epidermidis* em pacientes de unidades de transplante de medula óssea ocorrem geralmente nas primeiras 4 semanas após o procedimento, principalmente devido ao regime de imunossupressão, onde bactérias endógenas ganham o acesso a corrente sangüínea normalmente através de uso de CVC ou cateter de longa duração (KENNEDY et al., 2000). No caso específico destes pacientes, os fatores de risco são somados, tais como a neutropenia gerada pelo processo, uso do CVC, terapia e/ou profilaxia com quinolonas e/ou terapia com antibióticos de amplo espectro (KRCMERY et al., 1996).

Na análise geral, quando observamos os pacientes como um todo, o uso prévio de antifúngicos não foi estatisticamente significante, mas quando dados de pacientes pertencentes a grupos específicos, como no caso de pacientes da Hemato/TMO (n = 36), verificou-se que o uso prévio de antifúngicos foi estatisticamente significante (*P* = 0,004) revelando assim que grupos específicos podem estar mais susceptíveis a fatores de risco que outros. Neste caso em específico, pacientes desta especialidade fazem uso de antifúngicos como protocolo de prevenção para infecção fúngica, o que favorece por um lado mas acaba tornando o paciente susceptível a aquisição de infecção bacteriana, neste caso a ICS por *S. epidermidis*.

Dados norte americanos demonstraram que nos anos 70 a grande maioria dos casos de infecções de corrente sangüínea eram causadas por bacilos Gram negativos, correspondendo a 75% do total. Atualmente, 64% das infecções são causadas por Cocos Gram positivos contra 27% para bacilos Gram negativos (KARCHMER, 2000). Dados de 1992 estimavam o envolvimento de 2 milhões de pacientes anualmente com infecções hospitalares a um custo anual de aproximadamente U$ 4.5 bilhões (MMWR, 1992). Dados atuais relatam que aproximadamente 35 milhões de pessoas são admitidas nos hospitais norte americanos anualmente, deste total aproximadamente 10% (3,5 milhões) são

acometidos de infecções hospitalares e destes pacientes a ICS representa cerca de 350 mil pacientes levando à mortalidade cerca de 27% deste total. Esta taxa pode variar, de acordo com o microrganismo isolado (WENZEL et al., 2001; HUGONNET, et al., 2004).

Os dados epidemiológicos deste estudo demonstraram que a taxa de óbito foi maior no grupo de pacientes não tratados como infecção (48,8%) do que no grupo dos pacientes tratados (32,5%), embora os dados não apresentaram um resultado estatisticamente significante (P = 0,125) entretanto, uma análise com maior casuística seria desejável para confirmar nossos dados.

No caso deste estudo, todos os episódios de sepse caracterizaram-se por infecção microbiologicamente comprovada, com exame de hemocultura positiva (HUGONNET et al., 2004), embora em 53% dos casos o achado de *S. epidermidis* na corrente sangüínea do paciente tenha sido considerado como contaminação e ou colonização. Um total de 47% foram consideradas como infecções verdadeiras onde foram administradas terapias antimicrobianas corretas.

Nossos dados apontaram para a importância atual de *S. epidermidis* como causador de ICS em pacientes internados em hospital de atendimento terciário, porém faz-se necessário um maior número de estudos clínicos no Brasil para aprimorar o conhecimento microbiológico e epidemiológico de *S. epidermidis* em nossos hospitais.

6- CONCLUSÕES

Após a caracterização e análise do perfil molecular pela técnica de PFGE verificou-se a ocorrência da disseminação clonal de *S. epidermidis* e que o microrganismo permaneceu no ambiente hospitalar, no caso desta análise, durante 3 anos;

Verificou-se o alto índice de resistência a oxacilina nos isolados estudados com presença de heterogeneidade de resistência;

Ausência de resistência a vancomicina nos isolados estudados;

Há a necessidade de testes dilucionais quando analisamos glicopeptídeos, principalmente para teicoplanina;

O gene *mec*A foi facilmente detectado através da técnica de PCR, sendo possível detectar juntamente com os outros testes complementares a resistência heterogênea;

O gene *mec*A demonstrou-se bastante estável e geneticamente adaptado;

Neutropenia e quimioterapia foram as principais variáveis estatisticamente significantes nos dados avaliados para indicação do tratamento nos pacientes avaliados.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB Biodisk America Inc 2000. Etest package insert. **AB Biodisk** North America Inc., Piscatway, N.J., 2000.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. L. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nuc. Acids Res.**, 25(17): 3389-402, 1997.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica.** 4ª ed. São Paulo: Roca, 1994. 283p.

ARBER, R. C.; MACKEL, D. C. Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. **Am. J. Med.,** 70: 901-5, 1981.

ARCHER, G. L.; KARCHMER, A. W.; VISHNIAVSKY, N.; JOHNSTON, J. L. Plasmid-pattern analysis for the differentiation of infecting from noninfecting *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.,** 149(6): 913-20, 1984.

ARCHER, G. L.; DIETRICK, D. R.; JOHNSTON, J. L. Molecular epidemiology of transmissible gentamicin resistance among coagulase-negative staphylococci in a cardiac surgery unit. **J. Infect. Dis.,** 151(2): 243-51, 1985.

BANNERMAN, T. L.; HANCOCK, G. A.; TENOVER, F. C.; MILLER, J. M. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, 33(3): 551-5, 1995.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 8ª ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 384-404.

BERETTA, A. L. R. Z.; TRABASSO, P.; STUCCHI, R. B.; MORETTI, M. L. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital from 1991 to 2001. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(9): 1345-51, 2004.

BINGEN, E. Application of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.,** 15(7): 488-93, 1994.

BOGADO, I.; LIMANSKY, A.; SUTICH, E.; MARCHIARO, P.; MARZI, M.; PUTERO, J.; VIALE, A. Molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a neonatal intensive care unit. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 23(8): 447-51, 2002.

BOISSON, K.; THOUVEREZ, M.; TALON, D.; BERTRAND, X. Characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood infections: incidence, susceptibility to glycopeptides, and molecular epidemiology. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 21: 660-5, 2002.

BRITANNICA.COM and Encyclopaedia Britannica: Enciclopedia on-line. Disponível em: <http://www.britannica.com/infection>. Acesso em 22 Maio 2005.

BROWN, D. F. J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, 48(Suppl S1): 65-70, 2001.

BURNIE, J. P.; NADERI-NASAB, M.; LOUDON, K. W.; MATTHEWS, R. C. An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital-acquired infection. **J. Clin. Microbiol.,** 35(7): 1746-50, 1997.

CANTOR, C. R.; SMITH, C. L.; MATHEW, M. K. Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. **Ann. Rev. Biophys. Chem.**, 17: 287-304, 1988.

CARLE, G. F.; FRANK, M.; OLSON, M. V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science,** 232: 65-8, 1986.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Public health focus: surveillance, prevention, and control of nosocomial infections. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 41(42): 783-7, 1992.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Recommendation for preventing the spread of vancomycin resistance recommendations of the hospital infection control practices advisory committee (HICPAC). **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 44(RR12): 1-13, 1995.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 46(27): 626-628, 635, 1997.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin -- United States, 1997. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 46(33): 765-6, 1997.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin ---United States, 2002. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 51(26): 565-7, 2002.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Epi Info 2002. Division of public health surveillance and informatics. Disponível em <http://www.cdc.gov/epiinfo/downloads.htm>. Acesso 22 Maio 2005.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Brief report: vancomycin –resistant *Staphylococcus aureus* --- New York, 2004. **Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 53(15): 322-3, 2004.

CERCENADO, E.; GARCÍA-LEONI, M. E.; DÍAZ, M. D.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; CATALÁN, P.; BERNALDO DE QUIRÓS, J. C. L.; BOUZA, E. Emergence of teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, 34(7): 1765-8, 1996.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.,** 10(4): 781-91, 1997.

CHAMBERS, H. F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. **J. Infect. Dis.**, 179(Sppl 2): S353-9, 1999.

CHANG, M. R.; CARVALHO, N. C. P.; OLIVEIRA, A. L. L.; MONCADA, P. M. F.; MORAES, B. A.; ASENSI, M. D. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, 7(2): 149-60, 2003.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect Immun.**, 37(1): 318-26, 1982.

CHRISTENSEN, G. D.; PARISI, J. T.; BISNO, A. L.; SIMPSON, W. A.; BEACHEY, E. H. Characterization of clinically significant strains of coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, 18(2), 1983.

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric fields. **Science,** 234: 1582-5, 1986.

COUTO, I.; WU, S. W.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mec*A homologue native to the species. **J. Bacteriol.**, 185(2): 645-53, 2003.

CUI, L.; MA, X.; SATO, K.; OKUMA, K.; TENOVER, F. C.; MAMIZUKA, E. M.; GEMMELL, C. G.; KIM, M.; PLOY, M.; SOLH, N. E.; FERRAZ, V.; HIRAMATSU, K. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, 41(1): 5-14, 2003.

DALEY, C. L.; SMALL, P. M.; SCHECTER, G. F. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. Analysis using restriction-fragment length polymorphisms. **N. Engl. J. Med.,** 326: 231-5, 1992.

DEL'ALAMO, L.; CEREDA, R. F.; TOSIN, I.; MIRANDA, E. A.; SADER, H. S. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 34: 185-91, 1999.

DEPLANO, A.; VANNECHOUTTE, M.; VERSCHRAEGEN, G.; STRUELENS, M. J. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS*256* spacer length polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.,** 35(10): 2580-7, 1997.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Infection control epidemiology and clinical microbiology. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 8ª ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 129-138.

DOEBBELING, B. N.; HOLLIS, R.; EISENBERG, H. O.; WENZEL, R. P.; PFALLER, M. A. Restriction fragmentation analysis of *Candida tropicalis* outbreak of sternal wound infections. **J. Clin. Microbiol.,** 29: 1268-70, 1991.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, 7(2): 277-81, 2001.

EISENSTEIN, B. I. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. **J. Infect. Dis.,** 161: 595-602, 1990a.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **N. Engl. J. Med.,** 322: 178-83, 1990b.

FANG, F. C.; MCCLELLAND, M.; GUINEY, D. G. Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. **JAMA,** 270: 1323-8, 1993.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALMEIDA, R.; PORTILLO. V. A.; BARBOSA, T. A. P.; TREVILATO, P. B.; RAMALHO NETO, C. E.; COELHO, R. D.; SILVA, D. W.; BARTOLETI, L. A.; HANNA, E. S.; BROCCHI, M.; MANFIO, G. P. Drug resistance in *Chromobacterium vilaceum*. **Genet. Mol. Res.**, 3(1): 134-7, 2004.

FARRAR, W. E. Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigations. **J. Infect. Dis.,** 148: 1-6, 1983.

FERREIRA, R. B. R.; NUNES, A. P. F.; KOKIS, V. M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L. S.; BASTOS, M. C. F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K. R. N. Simultaneous detection of the *mec*A and *ile*S-2 genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 42: 205-12, 2002.

FILE Jr., T. M. Overview of resistance in the 1990s. **CHEST,** 115: 3s-8s. Supplement, 1999.

FINKELSTEIN, R.; FUSMAN, R.; OREN, I.; KASSIS, I.; HASHMAN, N. Clinical and epidemiologic significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a tertiary care university Israeli hospital. **Am. J. Infect. Control**, 30: 21-5, 2002.

FREBOURG, N. B.; LEFEBVRE, S.; BAERT, S.; LEMELAND, J. F. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. **J. Clin. Microbiol.,** 38(2): 877-80, 2000.

GALDBART, J. O.; MORVAN, A.; DESPLACES, N.; SOLH, N. E. Phenotypic and genomic variation among *Staphylococcus epidermidis* strains infecting joint prostheses. **J. Clin. Microbiol.**, 37(5): 1306-12, 1999.

GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORI, T. G.; HORAN, T. C.; HUGHES, J. M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **J. Infect. Control,** 16: 128-40. Special Article, 1988.

GELOSIA, A.; BALDASSARRI, L.; DEIGHTON, M.; VAN NGUYEN, T. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. **Clin. Microbiol. Infect.**, 7: 193-9, 2001.

GETCHELL-WHITE, S. I.; DONOWITZ, L. G.; DIETER, H. M.; GRÖSCHEL, D. H. M. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.,** 10: 402-7, 1989.

GILBERT, D. N.; MOELLERING Jr., R. C.; SANDE, M. A. **The Sanford: Guia para terapia antimicrobiana.** 33ª ed. Rio de Janeiro: EPUC, 2003. 150p.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.,** 14: 595-600, 1993.

GOERING, R. V.; DUENSING, T. D. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. **J. Clin. Microbiol.,** 28(3): 426-9, 1990.

GOERING, R. V.; WINTERS, M. A. Rapid method for epidemiological evaluation of Gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, 30(3): 577-80, 1992.

GRÄSER, Y.; KLARE, J.; HALLE, E.; GANTENBERG, R.; BUCHHOLZ, P.; JACOBI, H. D.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.,** 31: 2417-20, 1993.

GREISEN, K.; LOEFFELHOLZ, M.; PUROHIT, A.; LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.**, 32(2): 335-51, 1994.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic. Acids Res. Suppl.**, 41:95-8, 1999.

HANSSEN, A. M.; KJELDSEN, G.; SOLLID, J. U. E. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48(1): 285-96, 2004.

HARTSTEIN, A. I.; CHETCHOTISAKD, P.; PHELPS, C. L.; LeMONTE, A. M. Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.,** 22: 309-14, 1995.

HERWALDT, L. A.; WENZEL, R. P. Dynamics of hospital-acquired infection. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 6th ed. Washington, DC: ASM Press, 1995. p. 169-181.

HOIBY, N.; JARLOV, J. O.; KEMP, M.; TVEDE, M.; BANGSBORG, J. M.; KJERULF, A.; PERS, C.; HANSEN, H. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. **Lancet**, 349: 167-9, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **J. Clin. Microbiol.**, 36(4): 1083-9, 1998.

HUEBNER, J.; PIER, G. B.; MASLOW, J. N.; MULLER, E.; SHIRO, H.; PARENT, M.; KROPEC, A.; ARBEIT, R. D.; GOLDMANN, D.A. Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. **J. Infect. Dis.,** 169: 526-31, 1994.

HUGONNET, S.; SAX, H.; EGGIMANN, P.; CHEVROLET, J.; PITTET, D. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. **Emerg. Infect. Dis.**, 10(1): 76-81, 2004.

ISENBERG, H. D. Pathogenicity and virulence: Another view. **Clin. Microbiol. Rev.,** 1(1): 40-53, 1988.

JACOBY, G. A.; ARCHER, G. L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **N. Engl. J. Med.**, 324(9): 601-12, 1991.

JORGENSEN, M.; GIVNEY, R.; PEGLER, M.; VICKERY, A.; FUNNELL, G. Typing multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*: conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis. **J. Clin. Microbiol.**, 34(2): 398-403, 1996.

KARCHMER, A. W. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors, and implications. **Clin. Infect. Dis.**, 31(Suppl 4): S139-43, 2000.

KENNEDY, H. F.; MORRISON, D.; KAUFMANN, M. E.; JACKSON, M. S.; BAGG, J.; GIBSON, B. E. S.; GEMMELL, C. G.; MICHIE, J. R. Origins of *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus oralis* causing bacteraemia in a bone marrow transplant patient. **J. Med. Microbiol.**, 49: 367-70, 2000.

KHATIB, R.; RIEDERER, K. M.; CLARK, J. A.; KHATIB, S.; BRISKI, L.E.; WILSON, F. M. Coagulase-negative staphylococci in multiple blood cultures: Strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. **J. Clin. Microbiol.,** 33(4): 816-20, 1995.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.,** 7(1): 117-40, 1994.

KOMATSUZAWA, H.; OHTA, K.; YAMADA, S.; EHLERT, K.; LABISCHINSKI, H.; KAJIMURA, J.; FUJIWARA, T.; SUGAI, M. Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46(1): 75-81, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 5ª ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395p.

KOZITSKAYA, S.; CHO, S. H.; DIETRICH, K.; MARRE, R.; NABER, K.; ZIEBUHR, W. The bacterial insertion sequence IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. **Infect. Immun.**, 72(2): 1210-5, 2004.

KRCMERY Jr, V.; TRUPL, J.; DRGONA, L.; KACKA, J.; KUKUCHKOVA, E.; ORAVCOVA E. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 15: 259-61, 1996.

KREDIET, T. G.; JONES, M. E.; JANSSEN, K.; GERARDS, L. J.; FLEER, A. Prevalence of molecular types and *mec*A gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. **J. Clin. Microbiol.**, 39(9): 3376-8, 2001.

KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R. D.; EISNER, W.; MASLOW, J. N.; McGEER, A.; LOW, D. E.; NOVICK, R. P. Evidence for a Clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, 259: 227-30, 1993.

KRIMMER, V.; MERKERT, H.; VON EIFF, C.; FROSCH, M.; EULERT, J.; HÖHR, J. F.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, 37(8): 2667-73, 1999.

KUMARI, D. N. P.; KERR, V.; HAWKEY, P. M.; PARNELL, P.; JOSEPH, N.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.,** 35: 881-5, 1997.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DURVAL, J.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **N. Engl. J. Med.**, 319: 157-61, 1988.

LESKI, T. A.; TOMASZ, A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2a. **J. Bateriol.**, 187(5): 1815-24, 2005.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 16: S3-S10, 2000.

LOBO, R. D.; LEVIN, A. S.; GOMES, L. M. B.; CURSINO, R.; PARK, M.; FIGUEIREDO, V. B.; TANIGUCHI, L.; POLIDO, C. G.; COSTA, S. F. Impact of an educational program and policy chances on decreasing catheter-associated bloodstream infections in a medical intensive care unit in Brazil. **Am. J. Infect. Control.**, 33(2): 83-7, 2005.

LUPSKI, J. R. Molecular epidemiology and its clinical application. **JAMA,** 270: 1363-4, 1993.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res.**, 32: W327-31, 2004.

MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J. Med. Microbiol.,** 42: 328-35, 1995.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Clin. Microbiol.**, 34(12): 2888-93, 1996.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Correlation between the resistance genotype determined by Multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrob. Agents Chemother.,** 44(2): 231-8, 2000a.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.; J.; GRENIER, L.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46: 527-33, 2000b.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.,** 17(9): 153-64, 1993.

MASLOW, J. N.; SLUTSKY, A. M.; ARBEIT, R. D. The application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications.** Washington, DC. ASM Press, 1993. p. 563-72.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.,** 17(9): 595-604, 1996.

MAULE, J. Pulsed-field gel electrophoresis. **Mol. Biotechnol.**, 9: 107-26, 1998.

McDOUGAL, L. K.; THORNSBERRY, C. The role of β-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **J. Clin. Microbiol.**, 23(5): 832-9, 1986.

McKINNEY, T. K.; SHARMA, V. K.; CRAIG, W. A.; ARCHER, G. L. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mec*A) is corepressed but not coinduced by cognate *mec*A and β-lactamase regulators. **J. Bacteriol.**, 183(23): 6862-8, 2001.

MERRELL, D. S.; FALKOW, S. Frontal and stealth stack strategies in microbial pathogenesis. **Nature**, 430: 250-6, 2004.

MICKELSEN, P. A.; PLORD, J.J.; GORDON, K. P.; HARGISS, C.; McCLURE, J.; SCHOENKNECHT, R. D.; CONDIE, F.; TENOVER, F.C.; TOMPKINS, L.S. Instability of antibiotic resistance in a strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. **J. Infect. Dis.,** 152(1): 50-8, 1985.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PEREIRA, S. F. F.; KRISTINSSON, K.G.; WESTH, H.; JARLOV, J. O.; CARRIÇO, J.; ALMEIDA, J.; SANTOS-SANCHES, I.; LENCASTRE, H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. **J. Clin. Microbiol.**, 40(2): 430-8, 2002.

MORETTI, M. L.; BRATFICH, O. J.; STUCCHI, R. B.; LEVI, C.; LEVIN, A. S.; DUBOC, G. M.; VORMITTAG, E.; BLUM-MENEZES, D. Clonal dissemination of *van*A-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100 Km apart. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(9): 1339-43, 2004.

MULDER, J. G.; KOSTERINK, J. G. W.; DEGENER, J. E. The relationship between the use of flucloxacillin, vancomycin, aminoglycosides and ciprofloxacin and the susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci recovered from blood cultures. **J. Antimicrob. Chemother.**, 40: 701-6, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7th ed. Approved standard M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa, 2000a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 5th ed. Approved standard M100-S10. NCCLS, Wayne, Pa, 2000b.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically.** MIC testing. 5th ed. Approved Standards M100-S10 (M7). NCCLS, Wayne, Pa, 2000c.

NOUWEN, J. L.; VAN BELKUM, A.; DE MARIE, S.; SLUIJS, J.; WIELENGA, J. J.; KLUYTMANS, J. A. J. W.; VERBRUGH, H. A. Clonal expansion of *Staphylococcus epidermidis* strains causing Hickman catheter-related infections in a hemato-oncologic department. **J. Clin. Microbiol.**, 36(9): 2696-702, 1998.

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; BASTOS, C. C. R.; FONSECA, L. S.; SANTOS, K. R. N. Susceptibility of Brazilian staphylococcal strains to glycopeptides evaluated by different testing methods. **Curr. Microbiol.**, 44: 385-90, 2002.

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; BASTOS, C. C. R.; SILVA, M. G.; FERREIRA, R. B. R.; FONSECA, L. S.; SANTOS, K. R. N. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centers. **J. Hosp. Infect.**, 59: 19-26, 2005.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **J. Med. Microbiol.**, 50: 582-7, 2001.

O'GRADY, N. P.; ALEXANDER, M.; DELLINGER, E. P.; GERBERDING, J. L.; HEARD, S. O.; MAKI, D. G.; MASUR, H.; McCORMICK, R. D.; MERMEL L. A.; PEARSON, M. L.; RAAD, I. I.; RANDOLPH, A.; WEINSTEIN, R. A. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **Clin. Infect. Dis.**, 35:1281-307, 2002.

OLIVEIRA JÚNIOR, F.; FONSECA, M.; RAMALHO, M.; BREDT, C.; ABBOUD, C.; SILVA, A.; CAVALCANTE, N. Infecções de corrente sangüínea em pacientes adultos infectados pelo HIV. **APECIH J.,** 2, 1999.

OLIVEIRA, A. M.; RAMOS, M. C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 35(2): 175-80, 2002.

PATTERSON, J. E.; VECCHIO, J.; PANTELICK, E. L. Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit. **Am. J. Med.,** 91: 479-83, 1991.

PETER, J. B. The polymerase chain reaction: amplifying our options. **Ver. Infect. Dis.,** 13: 166-71, 1991.

PETERSON, L. R.; KELLY, P. J. The role of clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*- associated diarrhea. **Infect. Dis. Clin. North Am.,** 7: 277-93, 1993.

PETERSSON, A. C.; KAMME, C.; MIÖRNER, H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. **J. Clin. Microbiol.**, 37(6): 2047-50, 1999.

PETINAKI, E.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mec*A gene **Microb. Drug Resist.**, 7(3): 297-300, 2001.

PFALLER, M. A.; WAKEFIELD, D. S.; HOLLIS, R.; FREDRICKSON, M.; EVANS, E.; MASSANARI, R. M. The clinical microbiology as an aid in infection control: the application of molecular techniques in epidemiologic studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** 14: 209-17, 1991.

PFALLER, M. A. Epidemiological typing methods for mycosis. **Clin. Infect. Dis.,** 14(suppl.1): S4-S10, 1992.

POYART, C.; QUESNE, G.; BOUMAILA, C.; TRIEU-CUOT, P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative Staphylococci by using the *soda* gene as a target. **J. Clin. Microbiol.**, 39(12): 4296-301, 2001.

RAIMUNDO, O.; HEUSSLER, H.; BRUHN, J. B.; SUNTRARACHUN, S.; KELLY, N.; DEIGHTON, M. A.; GARLAND, S. M. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, 51: 33-42, 2002.

ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 47(12): 3926-34, 2003.

ROWE, F.; SUPERTI, S. V.; SCHEIBE, R. M.; DIAS, C. G. Agar diffusion, agar dilution, Etest®, and agar screening test in the detection of methicillin resistance in staphylococci. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 43: 45-8, 2002.

RUPP, M. E.; ARCHER, G. L. Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, 60(10): 4322-7, 1992.

RYFFEL, C.; TESCH, W.; BIRCH-MACHIN, I.; REYNOLDS, P. E.; BARBERIS-MAINO, L.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHI, B. Sequence comparison of *mec*A genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Gene**, 94(1): 137-8, 1990.

SADER, H. S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZOCCOLI, C.; JONES, R. N. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. **Braz. J. Infect. Dis.**, 3(2): 63-79, 1999.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.**, 5(4): 200-14, 2001.

SANTUCCI, S. G.; GOBARA, S.; SANTOS, C. R.; FONTANA, C.; LEVIN, A. S. Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. **J. Hosp. Infect.**, 53: 6-13, 2003.

SCHABERG, D. R.; TOMPKINS, L. S.; FALKOW, S. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram negative bacilli. **J. Clin. Microbiol.,** 13: 1105-10, 1988.

SCHWALBE, R. S.; STAPLETON, J. T.; GILLIGAN, P. H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. **N. Engl. J. Med.**, 316(15): 927-31, 1987.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell,** 37: 67-75, 1984.

SEIFERT, H.; BOULLION, B.; SHULZE, A.; PULVERER, G. Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.,** 15: 520-8, 1994.

SEIFERT, H.; GERNER-SMIDT, P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of Acinetobacter isolates. **J. Clin. Microbiol.,** 33: 1402-7, 1995.

SHARMA, M.; RIEDERER, K.; JOHNSON L. B.; KHATIB, R. Molecular analysis of coagulase-negative staphylococcus isolated from blood cultures: prevalence of genotypic variation and polyclonal bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, 33: 1317-23, 2001.

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

SILVA, G. D. I.; WILKINSON, J. A. R.; BUTTERY, J.; HERBERT, M.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J. Genetic population structure of coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants. **Clin. Infect. Dis.**, 33:1520-8, 2001.

SLOOS, J. H.; HORREVORTS, A. M.; VAN BOVEN, C. P.; DIJKSHOORN, L. Identification of multiresistant *Staphylococcus epidermidis* in neonates of a secondary care hospital using pulsed field gel electrophoresis and quantitative antibiogram typing. **J. Clin. Pathol.**, 51(1): 62-7, 1998.

SLOOS, J. H.; DIJKSHOORN, L.; VOGEL, L.; VAN BOVEN, C. P. A. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. **J. Clin. Microbiol.,** 38(7): 2488-93, 2000a.

SLOOS, J. H.; DIJKSHOORN, L.; VAN BOVEN, C. P. A. Septicaemias caused by a strain of *Staphylococcus haemolyticus* exhibiting intermediate susceptibility to teicoplanin in multiple intensive care unit patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, 45: 410-1, 2000b.

SNYDMAN, D. R. Infecciones nosocomiales e infecciones iatrogénicas. In: SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B. I.; GUERRA, H. **Microbiología: mecanismos de las efermedades infecciosas.** 2ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 1994. p. 898-905.

SOLL, D. R.; LOCKHART, S. R.; PUJOL, C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 8ª ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 139-61.

STEFANI, S.; VARALDO, P. E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, 9(12): 1179-86, 2003.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. Molecular typing methods: definition, application and advantages. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. eds, **Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications.** Washington, DC. ASM Press, 1993. p. 563-72.

TAMBIC, A.; POWER, E. G. M.; TALSANIA, H.; ANTHONY, R. M.; FRENCH, G. L. Analysis of an outbreak of non phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. **J. Clin. Microbiol.,** 35: 3092-7, 1997.

TEMPLETON, N. S. The polymerase chain reaction: history, methods and applications. In: **The diagnostic molecular pathology.** New York. Raven Press, 1992. p. 58-72.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HÉRBERT, G. A.; HILL, B.; HOLLIS, R.; JARVIS, W. R.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J.; McDOUGAL, L. K.; MILLER, J. M.; MULLIGAN, M.; PFALLER, M. A. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.,** 32: 407-15, 1994.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Guest commentary. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.,** 33(9): 2233-9, 1995.

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. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.,** 18(6): 426-39, 1997.

TENOVER, F. C.; LANCASTER, M. V.; HILL, B. C.; STEWARD, C. D.; STOCKER, S. A.; HANCOCK, G. A.; O'HARA, C. M.; McALLISTER, S. K.; CLARK, N. C.; HIRAMATSU, K. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. **J. Clin. Microbiol.,** 36(4): 1020-7, 1998.

TENOVER, F. C.; JONES, R. N.; SWENSON, J. M.; ZIMMER, B.; McALLISTER, S.; JORGENSEN, J. H. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. **J. Clin. Microbiol.**, 37(12): 4051-8, 1999.

TENOVER, F. C.; BIDDLE, J. W.; LANCASTER, M. V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerg. Infect. Dis.**, 7(2): 327-32, 2001.

TOJO, M.; YAMASHITA, N.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.,** 157(4): 713-22, 1988.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 35(1): 124-9, 1991.

TOMASZ, A. "Intelligence coup" for drug designers: crystal structure of *Staphylococcus aureus* β-lactam resistance protein PBP2A. **Lancet**, 361: 795-6, 2003.

TORREA, G.; OFFREDO, C.; SIMONET, M.; GICQUEL, B.; BERCHE, P.; PIERRE-AUDIGIER, C. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.,** 34: 1043-9, 1996.

TOWNSEND, D. E.; ASHDOWN, N.; BOLTON, S.; GRUBB, W. B. The use of cetyltrimethylammonium bromide for the rapid isolation from *Staphylococcus aureus* of relaxable and non relaxable plasmid DNA suitable for *in vitro* manipulation. **Letl. Appl. Microbiol.,** 1: 87-94, 1985.

TRINDADE, R. C.; BONFIM, A. C. R.; RESENDE, M. A. Conjunctival microbial flora of clinically normal persons who work in a hospital environment. **Braz. J. Microbiol.,** 31: 12-16, 2000.

VAN BELKUM, A.; MEIS, J. Polymerase chain reaction-mediated genotyping in microbial epidemiology. **Clin. Infect. Dis.,** 18: 1018-9, 1994.

VAN ELDERE, J.; PEETERMANS, W. E.; STRUELENS, M.; DEPLANO, A.; BOBBAERS, H. Polyclonal staphylococcal endocarditis caused by genetic variability. **Clin. Infect. Dis.**, 31: 24-30, 2000.

VILA, J.; MARCOS, A.; LLOVET, T.; COLL, P.; JIMENES DE ANTA, T. A comparative study of ribotyping and arbitrarily primed polymerase chain reaction for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumanni infection*. **J. Med. Microbiol.,** 41: 244-9, 1994.

VILLARI, P.; SARNATARO, C.; IACUZIO, L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. **J. Clin. Microbiol.,** 38(5): 1740-6, 2000.

VON EIFF, C.; REINERT, R. R.; KRESKEN, M.; BRAUERS, J.; HAFNER, D.; PETERS, G. Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin. **J. Clin. Microbiol.,** 38(8): 2819-23, 2000.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infect Dis.**, 2: 677-85, 2002.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes Infect.**, 4: 481-9, 2002.

WACHSMUTH, K. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. **Rev. Infect. Dis.,** 8: 682-92, 1986.

WANG, H. L.; YAN, S. Y.; JIN, D. Y. Reanalysis of published DNA sequence amplified from cretaceous dinosaur egg fossil. **Mol. Biol. Evol.**, 14(5): 589-91, 1997.

WEBER, S.; PFALLER, M. A.; HERWALDT, L. A. Role of molecular epidemiology in infection control. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, 11: 257-78, 1997.

WEBER, D. J.; RAASCH, R.; RUTALA, W. A. Nosocomial infections in the ICU. The growing importance of antibiotic-resistant pathogens. **Chest,** 115(Suppl): 34s-40s, 1999.

WEINSTEIN, R. A. Nosocomial infection update. **Emerg. Infect. Dis.**, 4(3): 416-20, 1998.

WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. **Emerg. Infect. Dis.**, 7(2): 174-7, 2001.

WIELDERS, C. L. C.; VRIENS, M. R.; BRISSE, S.; GRAAF-MILTENBURG, L. A. M.; TROELSTRA, A.; FLEER, A.; SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Evidence for in-vivo transfer of *mec*A DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, 357:1674-5, 2001.

WU, S.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Genetic organization of the *mec*A region in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus sciuri*. **J. Bacteriol.**, 180(2): 236-42, 1998.

YORK, M. K.; GIBBS, L.; CHEHAB, F.; BROOKS, G.F. Comparison of PCR detection of *mec*A with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, 34(2): 249-53, 1996.

ZHANG, Y. Q.; REN, S. X.; LI, H. L.; WANG, Y. X.; FU, G.; YANG, J.; QIN, Z. Q.; MIAO, Y. G.; WANG, W. Y.; CHEN, R. S.; SHEN, Y.; CHEN, Z.; YUAN, Z. H.; ZHAO, G. P.; QU, D.; DANCHIN, A.; WEN, Y. M. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). **Mol. Microbiol.**, 49(6): 1577-93, 2003.

PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES ORIGINADAS POR ESTA TESE

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI-BRANCHINI, M. L. Perfil de sensibilidade aos glicopeptideos de *Staphylococcus epidermidis* isolados de hemoculturas. Um alerta aos clínicos. Apresentação oral por O. J. Bratfich, no III Congresso Paulista de Infectologia. Piracicaba, São Paulo, Agosto 14-17, 2002.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; TRABASSO, P.; MORETTI-BRANCHINI, M. L. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility to glycopeptides of *Staphylococcus epidermidis* isolated from nosocomial bloodstream infections. In: SHEA – The Society for Healthcare Epidemiology of America. Arlington, Virginia, April 5-8, 2003. Poster Abstracts 221, p. 102, 2003.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI-BRANCHINI, M. L. Detecção de *Staphylococcus epidermidis* "Borderline" meticilina resistentes isolados de infecções de corrente sangüínea. **Braz. J. Infect. Dis.**, 7(Suppl 1): S116, 2003.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI-BRANCHINI, M. L. Epidemiologia molecular e susceptibilidade a antimicrobianos glicopeptideos de *Staphylococcus epidermidis* isolados de infecções de corrente sangüínea. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, SC, Novembro 17-20, 2003. Pôster abstracts IH 057, 2003.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI, M. L. AY929067 *Staphylococcus epidermidis* penicillin binding protein 2' (*mec*A) gene, partial cds. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Acesso em 01 de Junho 2005.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI, M. L. AY952297 *Staphylococcus epidermidis* strain G2 Pbp2' gene, partial cds. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Acesso em 01 de Junho 2005.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI, M. L. AY952298 *Staphylococcus epidermidis* strain G3 Pbp2' gene, partial cds. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Acesso em 01 de Junho 2005.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI, M. L. AY952299 *Staphylococcus epidermidis* strain G4 Pbp2' gene, partial cds. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Acesso em 01 de Junho 2005.

BRATFICH, O. J.; BLUM-MENEZES, D.; MORETTI, M. L. AY952300 *Staphylococcus epidermidis* strain G5 Pbp2' gene, partial cds. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Acesso em 01 de Junho 2005.

PUBLICAÇÃO REFERENTE À METODOLOGIA EMPREGADA NA TESE

MORETTI, M. L.; BRATFICH, O. J.; STUCCHI, R. B.; LEVI, C.; LEVIN, A. S.; DUBOC, G. M.; VORMITTAG, E.; BLUM-MENEZES, D. Clonal dissemination of *van*A-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* between hospitals of two cities located 100 Km apart. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(9): 1339-43, 2004.

8- ANEXOS

PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE

Protocolo de extração empregando o Kit Geneclean® II Q-BIOgene

1. Cortar a banda contendo o DNA imobilizado em gel de agarose.

Fazer este procedimento visualizando o DNA sobre luz Ultravioleta.

2. Determinar a massa de DNA (com agarose) em microgramas.

3. Determinar a massa de agarose fazendo aproximação com volume onde:

100 mg = 100 µL.

4. Transferir o pedaço de gel para um Eppendorf de aproximadamente 1,5 mL. Cortar o gel em pequenos pedaços (2mm) para facilitar a dissolução.

5. Adicionar um volume de NaI (solução) em quantidade igual a 4,5 vezes o volume de agarose e adicionar um volume de 0,5 X de TBE modificado ao gel.

6. Incubar o gel com a solução adicionada em banho-maria a 45 – 55ºC por um minuto.

7. Misturar delicadamente por inversão os Epp contendo a solução.

8. Continuar a incubação até que o gel seja dissolvido, aproximadamente 5 minutos.

9. Cálculo do volume de Glassmilk® necessário seguindo as considerações:

Volume final	DNA max	vol Glassmilk
<500 µL	<5 µg	5 µL
500-1000 µL	<7,5 µg	10 µL
1 mL	<12,5 µg	20 µL
3 mL	<50 µg	100 µL

10. Adicionar o volume de Glassmilk calculado e homogeneizar em vortex gentilmente.

11. Incubar a temperatura ambiente por 5 min. Para volumes superiores a 1 mL deixar por aproximadamente 15 minutos a temp ambiente, ir homogeneizando a cada 2 minutos manualmente para que a matriz de sílica entre em contato com o DNA.

12. Centrifugar os Epp a 14.000 g por 5 segundos. Descartar o sobrenadante.

13. Adicionar 500 µL da solução "New Wash" (preparada). Ressuspender a solução cuidadosamente por pipetação sugando e soltando varias vezes.

14. Centrifugar a 14.000 g por 5 segundos e descartar o sobrenadante.

15. Repetir o processo 13 e 14.

16. Após a remoção do sobrenadante é necessário centrifugar mais uma vez o material e descartar novamente o volume que estiver presente.

17. Secar o pelet formado pelo DNA e a matriz de sílica. Pode ser colocado em banho-maria, em sistema vácuo ou em banho seco a 55ºC por aproximadamente 5 a 10 minutos com os epp com a tampa levemente levantada. Obs: O resíduo de etanol interfere nas reações de seqüenciamento.

18. Adicionar um volume de água ou TE igual ao volume de Glasmilk adicionado. Homogeneizar gentilmente com pipetagem para dissolver o DNA na solução.

19. Centrifugar a 14.000 g por 30 segundos o pelet. REMOVER CUIDADOSAMENTE O SEBRENADANTE, O QUAL AGORA PASSOU A CONTER O DNA. Aproximadamente 80% do DNA inicial estará contido nesta solução.

Protocolo de extração de DNA para *Staphylococcus epidermidis* técnica de "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) equipamento CHEF DR III System (Bio Rad).

Protocolo baseado em, com modificações:

GOERING, R. V.; DUENSING, T. D. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. **J. Clin. Microbiol.,** 28(3): 426-9, 1990.

A. EXTRAÇÃO DO DNA

Dia 1:

Inocular aproximadamente 10 colônias de uma cultura de *Staphylococcus epidermidis*, com colônias isoladas a partir de Agar Sangue com 24 a 48 h de crescimento, em 20 mL de meio BHI (Brain Hart Infusion) a 37^{o}C sob agitação (Shaker) por 24 h.

Dia 2:

Centrifugar os tubos contendo as culturas a 5000 rpm por 5 min a 22^{o}C.

5000 rpm = 50 x 100

Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 5 mL de salina 0,85 % estéril (lavagem das células).

Centrifugar novamente a 5000 rpm por 5 min a 22^{o}C.

Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 1mL de salina estéril (0,85%).

Transferir a papa de células para tubos "Eppendorf" pré-pesados.

Centrifugar os tubos de “Eppendorf” a 12000 rpm por 3 min:

3 min x 60 s = 180 s = 18 x 10 s = P2

Aspirar a solução salina.

Pesar novamente os tubos. Determinar a massa de células subtraindo o peso inicial dos tubos “Eppendrof” do peso atual.

Equalizar o peso das células (µg) com o volume de salina (µL) a ser adicionado. Peso = volume. Ressuspender a massa de células utilizando um “votex”.

Transferir uma alíquota de 20 µL de cada suspensão de células para um novo tubo de “Eppendorf” e acrescentar 400 µL de EC Buffer.

Adicionar 3,5 µL de solução estoque de Lysostaphin (armazenada em “Freezer” a –20^{o}C).

Adicionar agarose a 2% em cada tubo de “Eppendorf” sendo:

Para cada 20 µL de suspensão de células adicionar 450 µL de agarose.

Preparo da agarose – Low Melt agarose a 2%

1 g de Low Melt agarose para 50 mL de H_2O (Millipore estéril).

Dissolver a Low Melt agarose na água utilizando banho-maria no forno de microondas. Distribuir 10 mL em tubos cônicos e guardar em geladeira.

Dispensar rapidamente a mistura de Low Melt agarose com a suspensão de células no moldes para PFGE, resfriar os blocos a 4^{o}C por 30 min (fazer 5 a 10 blocos por amostra).

Remover os blocos solidificados dos moldes em microplacas contendo 3 mL de EC Buffer.

Incubar por 5 horas a 37^{o}C dando preferência por incubação em “Shaker” (levemente).

Dia 3:

Aspirar a solução de EC Buffer.

Lavar os blocos por 3 vezes com 5 mL de TE (Hi-Molarity) com intervalos de 30 min utilizando "Shaker" com baixa rotação.

Aspirar a solução de TE (Hi-Molarity) e cobrir os blocos com 2 mL de solução ES:

ES = EDTA (pH 9,3)

Sarcosyl 1%

Exemplo: Volumes em mL

Amostra	(8 a 10)	(12)	(15)	(16 a 18)	(20 a 21)
Volume total	20	25	30	35	40
EDTA	16	20	24	28	32
Sarcosyl	04	05	06	07	08

Incubar durante uma noite ("overnight") a 50^{o}C.

Dia 4:

Aspirar a solução de ES.

Lavar os blocos com 5 mL de TE (Hi-Mol) com intervalos de 30 min por pelo menos 4 vezes.

Estocar os blocos em 5 mL de TE (Hi-Mol) em flaconetes a 4^{o}C.

B. DIGESTÃO DO DNA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO – *Sma*I

Dia 1:

Cortar os blocos o suficiente para o manuseio.

Transferir os blocos para microplacas.

Lavar com 3 mL de solução "Dummy no Salt" a temperatura ambiente por 4 horas, sendo 4 lavagens de 1 hora.

Aspirar a solução.

Transferir os blocos para tubo de "Eppendorf" ou microplaca e adicionar 300 µL de solução tampão R4 a cada frasco (deve ser preparado neste momento):

30 µL de R4 x 9 amostras = 270 µL

270 µL de H_2O Millipore estéril x 9 amostras = 2430 µL

Deixar com esta solução por 30 min em geladeira a 4^oC.

Aspirar este tampão.

Adicionar a solução de digestão, sendo 200 µL de volume final para cada bloco (a ser preparada neste momento):

4 µL de enzima Sma I x 9 amostras = 36 µL

20 µL de tampão R4 x 9 amostras = 180 µL

178 µL de H_2O Millipore estéril x 9 amostras = 1602 µL

Incubar a temperatura de 30^oC, por 6 a 24 h (de preferência em "Shaker").

Dia 2:

Aspirar a solução.

Adicionar 1 mL de TE (Low Molarity).

Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

Preparar o gel de agarose ultrapuro, grau cromossômico, a 1% em TBE 0,5X.

Dissolver o gel em forno de microondas e dispensar no molde.

Preparo do Gel de 150 mL:

Para gel de 10 amostras = 150 mL.

TBE 0,5X = 15 mL de TBE 5X:

135 mL de H_2O Millipore estéril.

1,5 g de agarose.

Após a solidificação resfriar o gel a 4^oC por no mínimo 30 min antes de tirar o molde dos blocos.

Inserir os blocos nos sulcos do gel. Deixar o 1 sulco para o marcador de peso molecular Lambda.

Selar os sulcos com agarose a 1% em TBE 0,5X.

Colocar o Gel na cuba de eletroforese contendo 2,2 L de TBE 0,5X e deixar estabilizar a temperatura de corrida durante cerca de 30 minutos.

Preparo do Tampão para Eletroforese:

220 mL de TBE 5X

1980 mL de H_2O destilada

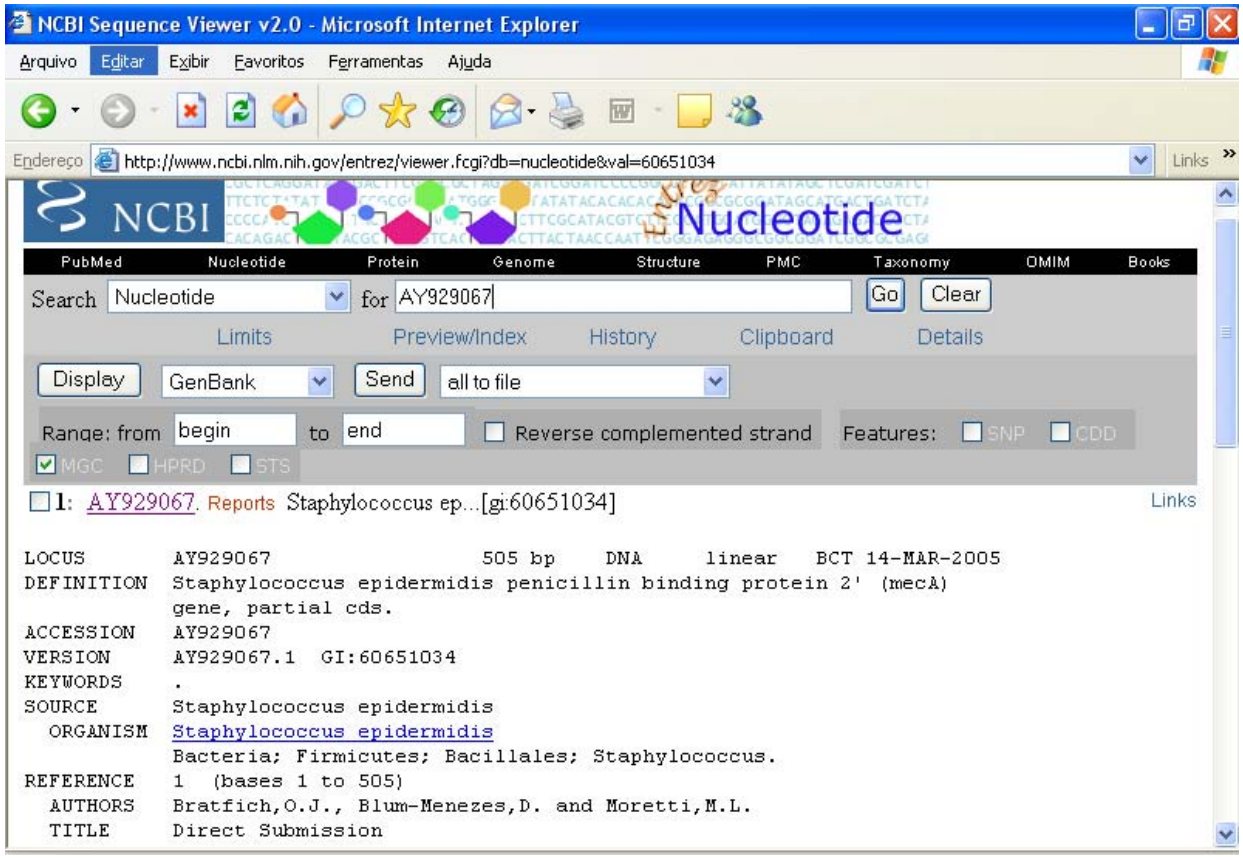
Condições de corrida:

Volts por cm	6 V/cm
Temperatura	14^oC
Tempo inicial	5 s
Tempo final	35 s
Tempo de corrida	20 h

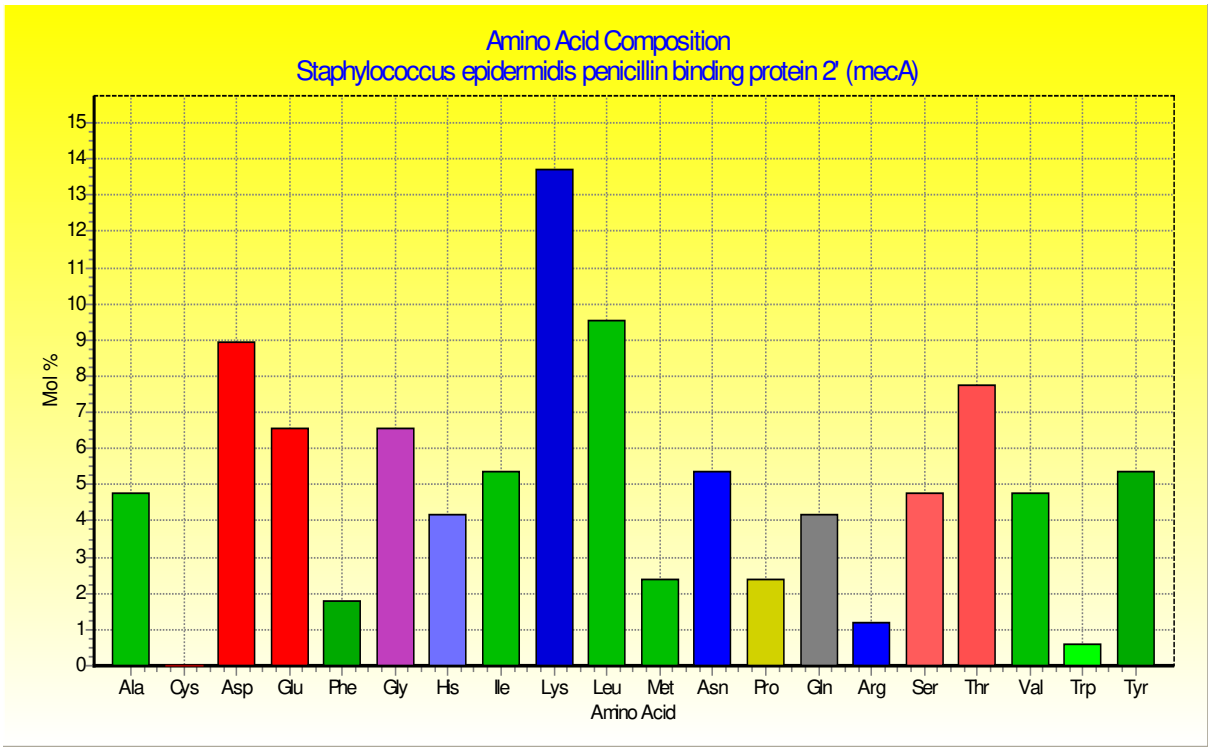
Ao final da corrida corar o gel com Brometo de Etídio por 30 min.

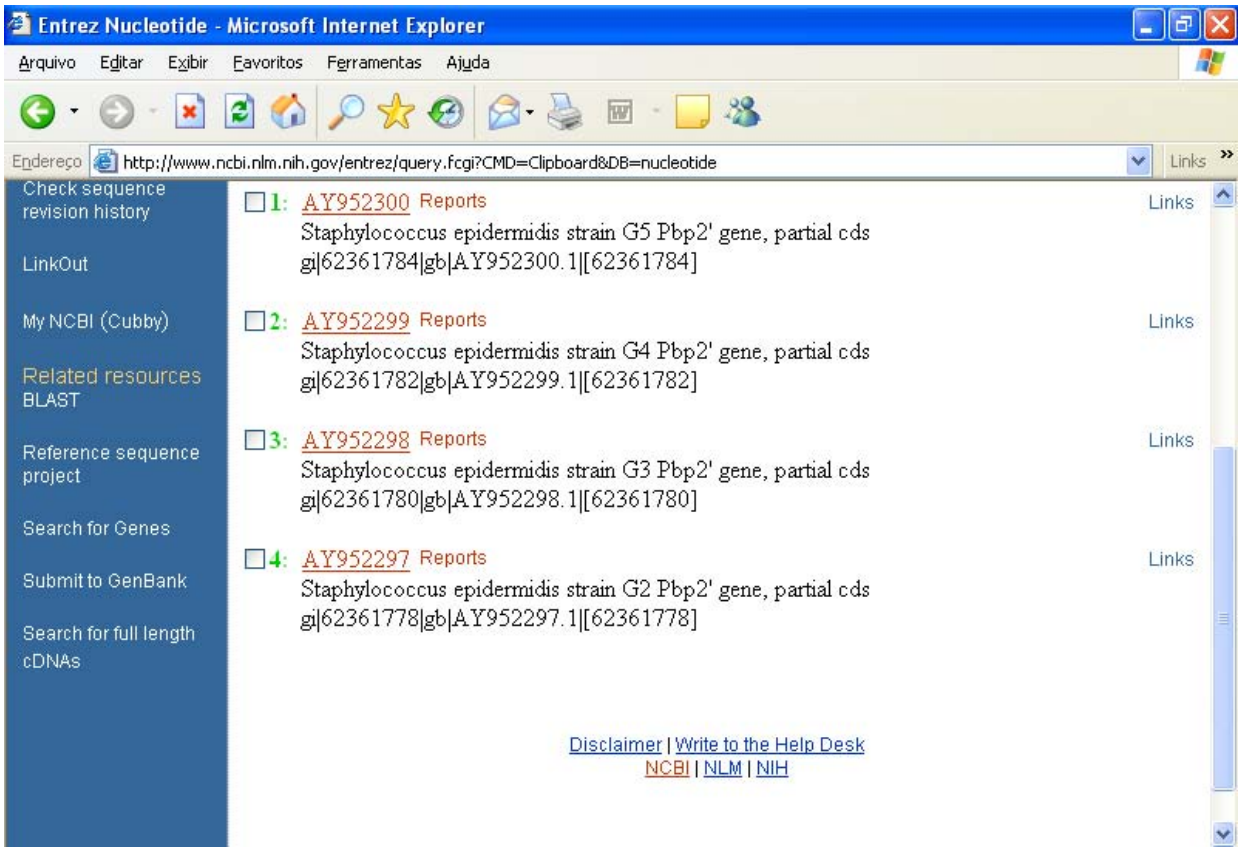
Fotografar sob luz ultravioleta.

Página do NCBI onde se encontra depositada a seqüência do fragmento do gene *mec*A com o número AY929067.



Composição da seqüência de aminoácidos traduzida a partir da seqüência de nucleotídeos do fragmento do gene *mec*A que foi depositado no NCBI AY929067.



Ala, alanina; Cys, cistina; Asp, ácido aspartico; Glu, ácido glutâmico; Phe, fenilalanina; Gly, glicina; His, Histidina; Ile, isoleucina; Lys, lisina; Leu, leucina; Met, metionina; Asn, asparagina; Pro, prolina; Gln, glutamina; Arg, arginina; Ser, serina; Thr, treonina; Val, valina; Trp, triptofano; Tyr, tirosina.

Página do NCBI onde se encontram depositadas a seqüências dos fragmentos do gene *mec*A, com os números AY952297, AY952298, AY952299 e AY952300, utilizadas para compor o estudo filogenético.