

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SIMILARIDADE GENÉTICA PELO RAPD-PCR DE CEPAS DE
STAPHYLOCOCCUS sp ISOLADOS DE PORTADORES
HUMANOS E DE CAMAS DE UMA UNIDADE HOSPITALAR**

Telma Luciana Trovó Fabiano

Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**SIMILARIDADE GENÉTICA PELO RAPD-PCR DE CEPAS DE
STAPHYLOCOCCUS sp ISOLADOS DE PORTADORES
HUMANOS E DE CAMAS DE UMA UNIDADE HOSPITALAR**

Telma Luciana Trovó Fabiano

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2007

T859s Trovó Fabiano, Telma Luciana
Similaridade genética pelo RAPD-PCR de cepas de
Staphylococcus sp isolados de portadores humanos e de camas de
uma unidade hospitalar / Telma Luciana Trovó Fabiano. – –
Jaboticabal, 2007
xii, 63 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Fernando Antonio de Ávila

Banca examinadora: Patrícia Amoroso, Branca Maria de Oliveira
Santos, Ruben Pablo Schocken-Iturrino, José Moacir Marin

Bibliografia

1. *Staphylococcus*. 2. PARD-PCR. 3. antimicrobianos-
multirresistência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:614.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação-Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TELMA LUCIANA TROVÓ FABIANO-

nascida em 18 de outubro de 1974, em Taquaritinga, SP, é Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, formada pelo Centro Universitário de Araraquara, em 04 de setembro de 1998. Mestre em Microbiologia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal em Janeiro de 2003.

"É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

(Martin Luther King)

A Deus,

Por ter me proporcionado saúde, persistência, determinação e muita paciência para a realização deste trabalho...

A minha filha Laís,

Por ser a minha vida e um presente de Deus!!!

Ao meu marido Fabiano,

Obrigada por tudo!!!

As minhas sobrinhas,

Maria Eduarda, Laura e Letícia,

Por serem meus amores!!!

Aos meus pais Sergio e Luzia,

Por serem tudo para mim...

As minhas irmãs Karina e Juliana,

Por serem a minha história!!!

Ao vô Antonio, vó Yvone e a tia Sueli,

Pela ajuda e dedicação!!!

A minha secretaria e amiga Páscoa,

Por cuidar da minha filha com carinho...

Não sou nada sem vocês...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila pela orientação, incentivo, paciência e confiança na condução desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Jaime Maia Santos pela paciência, apoio e amizade;

Ao Prof. Manoel Victor Franco Lemos por ceder reagente para a realização do experimento;

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela concessão de alguns equipamentos de seu laboratório;

A Prof^a. Cleusa Cascaes Dias e a Bruna Helena Pinheiro de Ávila do Centro Universitário Barão de Mauá pela ajuda e apoio na coleta das amostras;

A Josélia pela amizade e apoio técnico;

A Aliandra por ser minha amiga e estar sempre disposta a me ajudar;

A Lurdinha, Vanessa e Aline do laboratório IMUNOVIR e a Cibele por serem minhas amigas, por me ajudarem em todos os momentos e por estarem sempre ao meu lado;

A Andressa pelo apoio e carinho de sempre;

A Viviane e Lúcia pelo apoio, carinho e ajuda técnica;

A Martinha pelo auxílio, apoio e amizade;

Ao Renato pela amizade e ajuda;

A Ana Cláudia, Kátia, Cibele e João pela amizade e apoio;

Aos colegas mais recentes aqui não citados, porém, sempre lembrados, meus agradecimentos de coração;

As amigas Edilene e Vanessa por serem minhas amigas;

Aos Professores Doutores, membros da banca examinadora: Patrícia Amoroso, Branca Maria de Oliveira Santos, José Moacir Marin e Ruben Pablo Shocken-Iturrino pelas contribuições extremamente valiosas;

A todos os funcionários do Prédio da Microbiologia em especial a secretária Edna, pelo carinho, amizade e apoio nas horas difíceis;

Ao Departamento de Patologia Veterinária, Prédio da Microbiologia, por ceder a infra-estrutura para realização desse experimento;

A Santa Casa de Ribeirão Preto pela autorização na coleta das amostras;

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Pessoal), pelo apoio financeiro;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro;

Aos funcionários da biblioteca, pela ajuda no decorrer deste trabalho;

As funcionárias da Pós-Graduação da FCAV/UNESP-Jaboticabal pela atenção e ajuda durante o curso de doutorado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, através do corpo docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Microbiologia Agropecuária, pelas disciplinas ministradas;

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. <i>Staphylococcus</i>	5
2.1.1. Biologia e mecanismo de virulência.....	5
2.1.2. Infecção nosocomial por <i>Staphylococcus</i> e resistência antibiótica.....	9
2.1.3. Evolução da resistência antibiótica em <i>Staphylococcus</i> ...	13
2.1.4. Mecanismo de ação antibiótica e determinante genético da resistência.....	15
2.1.5. Métodos tradicionais, comerciais, bioquímicos e moleculares na tipificação e caracterização de <i>Staphylococcus</i> sp.....	20
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Coleta e isolamento das amostras.....	25
4.2. Identificação das amostras	26
4.2.1. Coloração de Gram.....	26
4.2.2. Provas bioquímicas.....	26
4.2.2.1. Prova de produção de catalase.....	26
4.2.2.2. Prova da fermentação do manitol.....	26
4.2.2.3. Prova da hemólise.....	27
4.2.2.4. Prova da desoxiribonuclease (DNase).....	27
4.2.2.5. Prova da coagulase em tubo.....	27
4.2.2.6. Prova da coagulase em lâmina.....	28

4.3. Amostras de Referências Positivas.....	28
4.4. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.....	28
4.5. Extração e purificação do DNA genômico.....	29
4.6. RAPD-PCR.....	30
4.7. Eletroforese em gel de agarose.....	30
4.8. Análise de similaridade.....	31
4.9. Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8. ANEXO 1.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número e porcentagem de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivas e negativas isoladas de 143 amostras de origem humana e de camas de um Hospital Escola.....	32
Tabela 2: Susceptibilidade de <i>Staphylococcus</i> sp isolados do Hospital Escola, aos onze antimicrobianos testados, através da técnica de difusão de disco.....	40
Tabela 3: Padrões e fenótipos de resistência a drogas entre cepas multirresistentes de <i>Staphylococcus</i> sp isolados de mãos de humanos e de camas de Hospital.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfis dos produtos de amplificação das amostras de DNA de <i>Staphylococcus</i> sp com iniciador 5'-d[CCCGTCAGCA]-3' através de PCR-RAPD.....	35
Figura 2: Filograma construído através do “software” FreeTree Win 95/98Nt, utilizando o coeficiente de distância DICE.....	37

**SIMILARIDADE GENÉTICA PELO RAPD-PCR DE CEPAS DE *Staphylococcus*
sp ISOLADOS DE PORTADORES HUMANOS E DE CAMAS DE UMA
UNIDADE HOSPITALAR**

RESUMO-

Foram coletadas 143 amostras de mãos de humanos e camas hospitalares, através de suabes em caldo BHI (Brain Heart Infusion), em um Hospital Escola de Ribeirão Preto, SP. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as cepas de *Staphylococcus* sp e verificar o grau de similaridade genética entre as cepas pelo RAPD-PCR e analisar o perfil de resistência a diversos antimicrobianos. As amostras coletadas foram incubadas a 37° C por 24 horas e após este período as culturas foram semeadas em placas de Petri contendo agar “*Staphylococcus* Médiu 110”. As colônias típicas do gênero *Staphylococcus* foram coletadas e estocadas a 4° C até o momento de elaboração das provas de produção de catalase e coagulase, fermentação do manitol, DNase e hemólise. As cepas isoladas foram analisadas através da técnica de RAPD-PCR para verificar o grau de similaridade. A sensibilidade das cepas isoladas foi testada frente a 11 diferentes antibióticos. Foram isoladas 92 cepas de *Staphylococcus* sp sendo 67 (72,8%) cepas de *Staphylococcus* coagulase negativas e 25 (27,2%) cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas. A análise de similaridade mostrou heterogeneidade genética entre as cepas. Foram encontradas oito (8,7%) cepas de *Staphylococcus* sp resistentes à vancomicina, sendo uma multirresistente a todos os antibióticos. Introduzir medidas de assepsia nas mãos de pessoal e leitos hospitalares e a racionalização do uso indiscriminado de antibióticos muito contribuirá para diminuição das infecções nosocomiais.

Palavras-chaves: índice de similaridade, RAPD-PCR, multirresistência, *Staphylococcus*.

GENETIC SIMILARITY BY RAPD-PCR OF *STAPHYLOCOCCUS* SP STRAINS ISOLATED FROM HUMAN AND BEDS A HOSPITAL

ABSTRACT-

A total of 143 samples were analyzed in this study. These included samples from human hands and hospital beds at a Medical Teaching Hospital of Ribeirão Preto, SP. This study aimed to characterize the strains of *Staphylococcus* sp and verify the degree of genetic similarity between the strains by RAPD-PCR and analyse the profile of the various antimicrobial resistance. Swabs samples were collected and cultured in brain heart infusion medium at 37° C for 24 h. Further cultivation was performed on *Staphylococcus* medium 110 agar plates. Typical colonies representing *Staphylococcus* genus were collected and stored at 4° C until it was used for identification tests, which included catalase, coagulase and mannitol production, hemolysis and Dnase. Isolates were analyzed by RAPD-PCR to verify similarity level. Antibiotic susceptibility was determined using 11 different antibiotics. A total of 92 *Staphylococcus* sp strains were isolated, whereas 67 (72.8%) were coagulase-negative *Staphylococcus* strains and 25 (27,2%) were coagulase-positive *Staphylococcus* strains. Similarity analysis revealed a great dissimilarity among isolates. High percentage of beta-lactams resistant *Staphylococcus* sp was found. Eight strains (8.7%) were vancomycin-resistant. A high percentage of multiresistant strains were found. Introduce of good hygiene practices for hands and hospital beds and adequate antibiotic use, may contribute to reduction of nosocomial infection and consequently improved antibiotic treatment response.

Key words: similarity index, RAPD-PCR, multiresistance, *Staphylococcus*.

1. INTRODUÇÃO

Infecções nosocomiais ou hospitalares são infecções adquiridas no hospital. O termo *nosocomial* vem da palavra grega *nósos*, que significa “doença” e *Komeion* que significa “hospital” (PELCZAR et al., 1996).

A infecção hospitalar é um problema sério e decorre de diferentes fatores. O uso racional de antibióticos e a adequação da lavagem das mãos são os pilares no controle da infecção por bactérias resistentes. O problema é bastante complexo e a atuação de uma comissão de controle de infecção é essencial para prevenir e monitorar os diferentes processos. É importante lembrar que o paciente hospitalizado pode trazer consigo uma população bacteriana selecionada ao longo de sua vida e o desequilíbrio da doença ou uma cirurgia podem favorecer a infecção por essas mesmas bactérias, sendo que 60,0% a 70,0% das infecções, definidas como hospitalares, podem ter origem endógena. Portanto, a infecção hospitalar não deve ser atribuída exclusivamente a fatores externos. Um hospital deve manter a higienização e as boas práticas de saúde, o que irá contribuir para taxas menores de infecção hospitalar. Mas é preciso tomar cuidado com o mito de hospital com taxa zero de infecção, é importante difundir esses conceitos com todos os profissionais de saúde.

O paciente hospitalizado está mais susceptível à seleção e disseminação de bactérias resistentes, mas a resistência bacteriana também ocorre na comunidade, que tem papel importante para minimizar o problema não se automedicando com antibióticos. A indicação do uso de antibióticos deve ser de responsabilidade médica e a resistência bacteriana é um processo de responsabilidade coletiva.

A ocorrência de infecção nosocomial depende da existência de uma fonte de infecção, da transmissão do agente etiológico e da susceptibilidade do paciente à infecção. Este ciclo de infecção deve ser interrompido para prevenir as infecções nosocomiais, todos os hospitais credenciados devem possuir um programa de controle de infecções. O controle de infecções abrange muitos aspectos, incluindo a vigilância de doenças entre pacientes e a equipe médica; a determinação do número

e dos tipos de microrganismos viáveis no ambiente hospitalar. Desta forma, os oficiais de controle de infecção hospitalar, os comitês de controles de infecção e a equipe do laboratório devem solucionar, em conjunto, casos de infecção nosocomial e prevenir novos casos. Os programas de controle de infecção bem-sucedidos requerem educação e cooperação de toda a equipe (PELCZAR et al., 1996).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) para diminuir o índice de infecção hospitalar é necessária a adoção de políticas nacionais de prevenção e controle de infecção estimulando a instalação de Comissões de Controle de Infecção em todos os hospitais. Em um estudo realizado pela OMS, comparando-se os hospitais com controle de infecção e os hospitais sem um programa de controle estabelecido, foi verificado um aumento de 18,0% nas infecções. O que permite concluir que pelo menos 1/3 das infecções podem ser evitadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 2000).

A ocorrência de infecções nosocomiais adquiridas nos hospitais ou outros ambientes clínicos são considerados importantes problemas no Brasil e em outras partes do mundo e principalmente nas UTI's, tendo grandes incidências em infecções causadas por condições clínicas destes pacientes (MICHELIM et al., 2005). A infecção hospitalar desenvolve-se em 5,0% dos pacientes admitidos em hospitais americanos e são responsáveis por 88.000 mortes anualmente, em 1992 foi estimado um gasto de 4,5 bilhões de dólares por ano, com custos de saúde relacionados a essas infecções (MARTINS & SILVINO, 2006).

O ambiente hospitalar é um importante reservatório para uma variedade de patógenos, embora alguns cuidados sejam tomados para impedir o crescimento de microrganismos no hospital. Uma razão é que certos membros da microbiota do corpo humano são oportunistas e apresentam um risco particularmente intenso para pacientes hospitalizados. A maioria dos microrganismos que causam infecções não causa doença em pessoas saudáveis, mas são patogênicas somente para indivíduos cujas defesas foram enfraquecidas pela doença ou terapia (TORTORA et al., 2000).

O risco de adquirir infecção em um hospital é diretamente proporcional à gravidade da doença, às condições nutricionais do paciente, aos procedimentos necessários em seu tratamento, bem como ao tempo de internação (MOURA & SILVA, 2001). Essas infecções hospitalares geralmente são provocadas pela própria microbiota bacteriana humana, que se desequilibra com os mecanismos de defesa

anti-infecciosa em decorrência da doença, dos procedimentos invasivos e do contato com a microbiota hospitalar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2000).

O uso indiscriminado de antibióticos pela população e pelos profissionais de saúde vem contribuindo para a seleção de uma população de bactérias altamente resistentes e que preocupam toda a classe médica. O Brasil é um dos países com índices preocupantes de resistência bacteriana, especialmente porque a população tem o hábito de praticar a automedicação em situações como gripe e dor de garganta viral, em que o antibiótico não tem indicação.

As bactérias como todos os seres vivos, se organizam para sobreviver, esses microrganismos são bastante “inteligentes” e vão tentar de diferentes formas encontrarem mecanismos de defesa (resistência) contra os antibióticos. Hoje a exposição a antibióticos é muito grande, tanto na medicina humana quanto na veterinária e na agricultura. A resistência bacteriana é um dos mecanismos de defesa dessas bactérias para continuarem sobrevivendo. Há bactérias em nosso organismo que colonizam intestino e mucosas de forma harmônica, contribuindo para nossas defesas. Hábitos saudáveis, como higiene e boa alimentação contribuem para que o organismo mantenha suas bactérias em harmonia.

A desarmonia pode ocorrer quando o indivíduo está sendo medicado com antibióticos ou por estar ingerindo alimento com resíduos de antibióticos. O consumo de qualquer tipo de antibiótico afeta um determinado grupo bacteriano que é sensível e, naturalmente seleciona o grupo que é resistente em diferentes graus. O tipo de antibiótico, a dose e o tempo de tratamento é que modulam essa equação. O uso indiscriminado de antibióticos favorece uma seleção progressista de bactérias resistentes que podem ter papel importante em infecções futuras quando a resistência imunológica do paciente se desequilibra.

As bactérias multirresistentes permeiam todas as especialidades, porém, em diferentes graus. Pacientes com morbidades e ou imunodeprimidos estão mais propensos aos processos infecciosos. Nos países nórdicos, por exemplo, cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRSA) são infreqüentes com taxas menores que 15,0%, enquanto que em países como Estados Unidos, Grécia e Brasil essas taxas podem chegar a ser superior a 50,0%. Dependendo do tipo de paciente e do tipo de hospital, as taxas médias de resistência também podem variar. Conhecer a realidade microbiológica é uma necessidade para que os médicos possam ajustar a antibioticoterapia de forma orientada e, nessa etapa, o laboratório de microbiologia é

fundamental. Trabalhos recentes da literatura demonstram que o uso inadequado de antibiótico nas primeiras 48 horas de infecção pode aumentar as taxas de morbidade e mortalidade.

Atualmente, a classificação taxonômica de microrganismos segue uma tendência de análise multifásica que envolve diferentes abordagens metodológicas. Neste contexto, técnicas de biologia molecular associada a técnicas bioquímicas e microbiológicas, procuram oferecer um número maior de informações que possibilitem uma classificação mais segura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Staphylococcus*

2.1.1. Biologia e mecanismo de virulência

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* composto por 37 espécies das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (KLOOS, 1997). Essas bactérias são geralmente encontradas na pele, glândulas da pele e mucosas do homem e animais. Algumas espécies são isoladas de produtos animais e do meio ambiente, outras são patógenos oportunistas para humanos e ou animais (KONEMAN et al., 2001).

Os estafilococos caracterizam-se por serem células esféricas, medindo cerca de 0,5-1,5 μm de diâmetro, os quais podem apresentar-se isoladas, aos pares ou em tétrades (agrupamentos de quatro cocos, assumindo freqüentemente a forma de cachos irregulares). São Gram positivos, imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, porém, desenvolvem-se melhor em atmosfera aeróbia. A parede celular é composta de peptidoglicano e ácido teicóico. São catalase positivos, sendo encontradas apenas uma pequena porcentagem de estafilococos que não produzem esta enzima. São microrganismos quimio-organotróficos, apresentando metabolismo respiratório e fermentativo. Vários carboidratos podem ser utilizados em aerobiose, com produção de ácido. Os cocos Gram positivos são relativamente resistentes ao potencial redutor da água e tolerantes ao ressecamento e altas temperaturas e concentração de sal. Esta habilidade para crescer em meios com alta concentração salina facilita seu isolamento. Um inóculo semeado em uma placa contendo meio de cultura adequado acrescido de 7,5% de NaCl, incubada em condições de aerobiose, permite o desenvolvimento seletivo de colônias de cocos Gram positivos (KLOOS, 1997; BARG et al., 1991).

Tradicionalmente, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Esta divisão baseia-se na produção da coagulase, uma enzima capaz de coagular o plasma, o que se constitui em um marcador de patogenicidade entre os estafilococos (HARMON et al., 1990). O teste de coagulase em tubo é empregado nesta classificação. Entre os coagulase positivos, a espécie *Staphylococcus aureus* é geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar (RICARDO, 2004).

Historicamente, *S. aureus* tem sido considerado como a bactéria que apresenta hemólise completa em agar sangue e resultado positivo no teste de coagulase em tubo após quatro horas de incubação (HARMON et al., 1990). Há registros do isolamento de cepas de *S. aureus* coagulase negativo (MLYNARCZYK et al., 1998), fato que pode levar os erros na identificação deste microrganismo. As espécies coagulase negativas têm merecido atenção especial devido à emergência de cepas resistentes a múltiplos antibióticos (RICARDO, 2004; MELO et al., 2005).

O principal mecanismo de defesa do hospedeiro frente a uma infecção estafilocócica é representado pela fagocitose, já que os estafilococos são bactérias tipicamente extracelulares. Os fatores de virulência produzidos por este microrganismo interferem principalmente neste mecanismo de defesa e promovem aderência da bactéria às células do hospedeiro, possibilitando assim o processo de colonização (ATLAS, 1997).

Os mecanismos de patogenicidade típicos dos *S. aureus* (coagulase-positivo) estão relacionados com características que dependem da estrutura da bactéria, tais como a rigidez da parede celular e a presença de uma cápsula antifagocítica. Algumas cepas de *S. aureus* produzem um exopolissacarídeo que compõe esta estrutura denominada cápsula, responsável por dificultar a fagocitose por polimorfonucleares e aderência da bactéria às células do hospedeiro e dispositivo prostético (KONEMAN et al., 2001).

A parede celular de *S. aureus* contém uma proteína, a proteína A, que tem a habilidade de ligar-se à região FC das moléculas de imunoglobulinas G (IgG). A proteína A funciona como um fator de virulência por interferir com o processo de opsonização. Neste processo os microrganismos ou partículas são recobertos por anticorpos e complemento ou outros fatores, sendo então preparados para o reconhecimento e posterior ingestão pelas células fagocíticas. A interferência neste processo em estafilococos desencadeia uma reação de hipersensibilidade dos tipos

imediate e tardia (KONEMAN et al., 2001). Os próprios constituintes da parede celular de *S. aureus* (peptídeoglicano e ácido teicóico) apresentam atividades biológicas que contribuem para sua virulência, além de conferirem rigidez à parede celular. Entre estas atividades está a inibição de quimiotaxia de células inflamatórias (MADIGAN et al., 1997).

Além dos mecanismos estruturais, outros mecanismos são responsáveis pela interferência no processo de defesa do hospedeiro, como a produção de substâncias extracelulares, tais como as exotoxinas (hemolisinas, leucocidinas, etc.) e as enzimas (coagulases, lípases, DNAses, β -lactamases, etc). Os estafilococos podem produzir uma variedade de proteases, nucleases e lipases que atuam despolimerizando proteínas, ácidos nucleicos e gorduras, respectivamente. Estas enzimas propiciam maior poder invasivo às bactérias que as produzem (KONEMAN et al., 2001).

Entre as toxinas extracelulares relacionadas com o arsenal patogênico de *S. aureus*, as leucocidinas são toxinas capazes de alterar a morfologia e função das células de defesa do hospedeiro. Além desta, as toxinas esfoliativas (ET) e os superantígenos tóxicos pirogênicos (PTSAg), que compreendem a toxina da Síndrome do Choque Tóxico 1 (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (SE), produzem doenças específicas como a síndrome estafilocócica da pele escaldada, síndrome estafilocócica do choque tóxico, síndrome da morte infantil prematura e intoxicações alimentares. Além de suas propriedades tóxicas específicas, os membros da família PTSAg compartilham características estruturais e biológicas como pirogenicidade, superantigenicidade e habilidade em aumentar a suscetibilidade ao choque endotóxico (WALDVOGEL, 2000; CSUKAS et al., 2001; EFUNTOYE & ADETOSOYE, 2003).

Um dos fatores de patogenicidade que diferencia os *S. aureus* das demais espécies de estafilococos é sua capacidade de coagular o plasma, por reação direta com o fibrinogênio. Essa reação produz fibrina, que recobre as células bacterianas, permitindo sua rápida aglutinação e fagocitose das mesmas. Esta propriedade é conferida tanto pela presença da coagulase livre como pela coagulase ligada ou fator de agregação (“clumping”), presente em algumas cepas de *S. aureus* na superfície da parede celular (KLOOS, 1997).

A pesquisa de fator “clumping” não deve ser a prova de escolha para caracterizar *S. aureus*, pois usualmente cepas deficientes deste fator produzem coagulase livre, que é pesquisada no teste da coagulase em tubo. A coagulase livre é

secretada extracelularmente e reage com uma substância no plasma chamada “fator de reação da coagulase” (FRC), formando um complexo que reage com o fibrinogênio com subsequente formação de fibrina (KONEMAN et al., 2001). Segundo MLYNARCZYK et al. (1998), cerca de 20% dos *S. aureus* (meticilina resistentes e sensíveis) isolados na Polônia eram coagulase negativos. Ambas, coagulase livre e conjugada atuam formando uma película envolvente ao redor da célula bacteriana, fornecendo proteção contra opsonização, fagocitose e dificultando a atuação de agentes antimicrobianos. Por outro lado, a formação desta película pode limitar a infecção a um determinado local. Fibrinolisinias produzidas por *S. aureus* podem, no entanto, lisar esta fibrina e permitir que a infecção se espalhe para tecidos adjacentes (MADIGAN et al., 1997).

A enzima catalase produzida pelos estafilococos protege a bactéria contra os ataques com superoxidantes produzidos como defesa pelos leucócitos. A catalase tem a função de inativar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto tóxico que é produzido dentro de células fagocíticas após a fagocitose do microrganismo. A produção da catalase pelos estafilococos constitui-se também numa importante prova para diferenciá-los dos estreptococos, que são catalase negativos (KLOOS, 1997).

Algumas provas adicionais utilizadas na caracterização dos estafilococos referem-se à fermentação do manitol, endonuclease termoestável e teste da DNase (KLOOS & BANNERMAN, 1995). A fermentação de manitol é utilizada com frequência para a seleção de colônias de *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* spp. Os estafilococos patogênicos coagulase-positivos fermentam o manitol produzindo colônias amarelas circundadas por um halo da mesma cor. As outras espécies coagulase negativas não fermentam o manitol e crescem como pequenas colônias vermelhas circundadas por um halo vermelho ou de cor púrpura. A diferença de coloração é causada pela reatividade do indicador vermelho fenol, o qual se apresenta vermelho em pH alcalino e amarelo em pH ácido (TRABULSI et al., 2005). No teste de DNase é verificada a atividade de desoxirribonuclease das bactérias, o qual é utilizado para evidenciar amostras de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. intermedius* de outras bactérias deste gênero (KLOOS & BANNERMAN, 1995).

2.1.2. Infecção nosocomial por *Staphylococcus* e resistência antibiótica

A espécie humana é um reservatório natural de *S. aureus*. Estes organismos colonizam normalmente a pele e as membranas mucosas, as vias aéreas superiores, o trato intestinal e o períneo. Desta forma, *S. aureus* pode ser parte da microbiota da pele e mucosas em indivíduos aparentemente saudáveis, entretanto, sob condições apropriadas, pode ser causa de infecções oportunistas (RICARDO, 2004). A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto com um indivíduo portador (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDCP, 2001). Em ambientes hospitalares, ocorre principalmente pelas mãos de profissionais de saúde (ELLIOT et al., 2002) ou por contato indireto, através de objetos contaminados (RICARDO, 2004). As transmissões ambientais e por vias aéreas são incomuns, exceto condições especiais, como em unidades de queimados e de terapia intensiva (UTI), onde podem ocorrer através de pacientes traqueostomizados com pneumonia por *S. aureus* (CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY-INFECTIOUS DISEASES AND IMMUNIZATION COMMITTEE - CPS-IDIC, 1999). Uma infecção por *S. aureus* pode ser ainda de origem endógena (PERL et al., 2002), ou seja, a bactéria presente na pele ou mucosa do próprio indivíduo pode penetrar na corrente sanguínea, principalmente se a barreira cutânea for rompida.

A taxa de colonização de *S. aureus* na população em geral é considerada alta. Uma pesquisa entre 5.000 cidadãos saudáveis dos EUA foi feita para determinar o estado portador de MRSA. Na população estudada, 32,0% eram portadores de *S. aureus* e 0,84% de MRSA (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDCP, 2001). Entretanto, alguns grupos como os de profissionais de saúde, pacientes portadores de doenças dermatológicas ou com cateteres vasculares de longa permanência, usuários de drogas injetáveis e diabéticos insulino-dependentes, apresentam geralmente taxas de colonização mais elevadas. Crianças menores tendem a apresentar também taxas elevadas de colonização por *S. aureus*, provavelmente devido ao contato freqüente com secreções respiratórias delas mesmas. Em todos estes casos, a colonização pode ser uma condição transitória ou persistente, podendo prolongar-se por anos (RICARDO, 2004).

As condições que favorecem as infecções causadas por *S. aureus* estão relacionadas à debilidade do sistema imunológico e outras situações, incluindo:

problemas no mecanismo de fagocitose, injúrias da pele, infecções por outros agentes (particularmente vírus), doenças crônicas, alcoolismo, administração de antimicrobianos como medida profilática ou terapêutica e presença de corpos estranhos no organismo (suturas e dispositivos protéticos). Nestas circunstâncias, *S. aureus* pode causar uma variedade de processos infecciosos, desde infecções de pele relativamente benignas (foliculite, impetigo, furúnculos) até infecções profundas de caráter bastante grave. Este microrganismo é isolado freqüentemente em incisões cirúrgicas, as quais podem funcionar como foco para o desenvolvimento de infecções sistêmicas. A ocorrência de endocardites, osteomielite, meningite e formação de abscessos metastáticos em vários órgãos após bacteremia por *S. aureus* é comumente relatadas. Várias infecções causadas por esta bactéria ocorrem como complicações de procedimentos invasivos comuns na medicina moderna (KONEMAN et al., 2001).

Em patologia humana as espécies do gênero *Staphylococcus* que se destacam são *S. aureus* (entre os coagulase-positivos), *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (entre os coagulase-negativos). Destes, *S. aureus* é considerado um dos patógenos humanos mais importantes, estando relacionado a inúmeros processos infecciosos (COHEN, 1986).

Apesar dos avanços obtidos pela medicina nos últimos anos, a infecção hospitalar ou nosocomial continua fazendo um número significativo de vítimas pelo mundo. Considera-se infecção nosocomial ou hospitalar toda infecção adquirida durante a internação ou após a alta médica, surgindo em decorrência da internação ou do uso de procedimentos invasivos que possam estar relacionados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). A estimativa mundial é de aproximadamente três milhões de pessoas vítimas de infecções hospitalares todos os anos, destes, são registrados cerca de cinquenta mil mortos (STATISTICAL REPORT INFECTION CONTROL THROUGH SURVEILLANCE - HELICS-SSI, 2006).

O controle da infecção hospitalar tem sido apontado como um dos grandes desafios nas instituições de saúde. Elas ocorrem principalmente pela transmissão dos agentes microbianos encontrados em ambientes hospitalares ou naturalmente presentes nos corpos dos pacientes, principalmente os internados em UTI, cuja situação de fragilidade os tornam vulneráveis a ação destes microrganismos que aproveitam para se espalhar (KONEMAN et al., 2001).

Com a descoberta da penicilina em 1940, deu-se início a era dos antibióticos, aparentemente, sendo a solução para a cura das infecções bacterianas. Entretanto, na década de 50, com o uso indiscriminado dos antimicrobianos, surgem nos Estados Unidos da América cepas de *Staphylococcus* resistentes à penicilina, culminando em surtos entre crianças e idosos hospitalizados. O aparecimento das bactérias resistentes demandou na diminuição do perfil de sensibilidade dos microrganismos, gerando a seleção de bactérias multirresistentes (TORTORA et al., 2005).

De acordo com vários trabalhos da literatura a resistência aos antibióticos dentro do gênero *Staphylococcus* foi relatada em 1944, um pouco depois de quando a penicilina foi introduzida, mais de 94% dos isolados eram sensíveis a esta droga. Este número reduziu a metade em meados dos anos 50 e hoje em torno de 80 a 90% dos isolados são resistentes. Dados similares foram encontrados em hospitais do Brasil (MARTINS & CUNHA, 2007).

Entre os microrganismos causadores de infecção nosocomial, estão os multirresistentes aos antimicrobianos, como os do gênero *Staphylococcus*. *S. aureus* é o agente etiológico mais comum entre todos os isolados freqüentemente associados a infecções nosocomiais. É considerado o primeiro patógeno em freqüência nas infecções de sítio cirúrgico e o segundo em infecções da corrente sangüínea e pneumonias (RICARDO, 2004). Sua importância como agente de infecções nosocomiais é acentuada pela marcante tendência à resistência antibiótica deste microrganismo. A presença destes microorganismos multirresistentes em ambientes hospitalares representa um dos maiores problemas de saúde pública mundial (BURD et al., 2003).

A resistência antimicrobiana resulta em morbidade, mortalidade e custos no tratamento de saúde. As medidas de prevenção da emergência e da disseminação de microrganismos resistentes podem reduzir estes efeitos adversos. A administração apropriada de um antimicrobiano, que inclui seleção, dose e duração ótimas do tratamento, assim como o controle do uso do antibiótico, pode impedir ou retardar a emergência da resistência entre microrganismos. Além disto, um programa eficiente de controle de infecção pode impedir a disseminação de cepas resistentes (SHLAES et al., 1997).

Diversos fatores devem ser considerados ao se avaliar a resistência antimicrobiana em um hospital, pois existem diferenças significativas na resistência antimicrobiana entre unidades de saúde. Estas diferenças podem estar relacionadas

tanto ao uso dos antimicrobianos quanto às práticas de controle de infecção adotadas. A amplitude do problema só pode ser determinada com o total conhecimento do padrão de uso de antimicrobianos do hospital (FRIDKIN & GAYNES, 1999). As estratégias para o controle da resistência e o uso de antimicrobianos só serão bem sucedidas quando todo o sistema de saúde passar a ver este problema como vital. Uma abordagem orientada e multidisciplinar do sistema, envolvendo a liderança do hospital, é necessária para o sucesso no combate do problema crescente da resistência antimicrobiana (GOLDMANN et al., 1996).

O uso indiscriminado de antibióticos é a principal causa do aumento do número de agentes patogênicos resistentes, tais como o *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA). No continente europeu, o MRSA desenvolveu resistência a diversos antibióticos (GOOSENS et al., 2005).

Além do MRSA, os fenótipos resistentes mais encontrados em ambientes hospitalares incluem o *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e *Staphylococcus* coagulase negativo com resistência intermediária à vancomicina (VICO NS), os quais mostram resistência intermediária; *S. aureus* com resistência à vancomicina (VRSA) para o qual a concentração inibitória mínima (MIC) de vancomicina é ≥ 32 ug/mL e hVISA/hVICO NS, uma forma resistente com um MIC de ≥ 8 ug/mL (LALEY et al., 2004; MARCHESE et al., 2000; TENOVER, 2000).

A introdução de penicilinas semi-sintéticas (metilina, oxacilina) na terapêutica parecia ter resolvido o problema de inativação das penicilinas pelas β -lactamases, entretanto, a resistência a estes antimicrobianos vem aumentando nos últimos anos, chegando a 60% de resistência entre cepas hospitalares de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos (MRSA) (ARCHER & CLIMO, 1994; MASSIDA et al., 1992). Amostras de MRSA são, geralmente, resistentes a inúmeros antimicrobianos, incluindo todos os outros β -lactâmicos, os macrolídeos, as lincosaminas, os aminoglicosídeos, o cloranfenicol e a tetraciclina.

No Brasil, o MRSA é responsável por percentuais elevados, chegando até 70% das cepas de *S. aureus* isoladas em diversos hospitais do país (LEVY et al., 1991; REZENDE et al., 1994). A identificação de uma cepa de MRSA de origem comum entre diferentes instituições brasileiras sugere que a transmissão desse microrganismo ocorre entre instituições hospitalares (SADER et al., 1994).

As infecções por MRSA apresentam letalidade alta, maior inclusive que os *S. aureus* sensível à oxacilina (OSSA) (ASENSIO et al., 1996; ROMERO-VIVAS et al.,

1995). Estudos mostraram que há relação direta entre a mortalidade e resistência à oxacilina (ROMERO-VIVAS et al., 1995). Além disto, MRSA foi identificado como fator de risco independente para a letalidade (CONTERNO, 1994). MOREIRA et al. (1998), observou alta proporção de sepse hospitalares por MRSA em pacientes internados em hospital de ensino. A incidência de pacientes com sepse por MRSA representou 73,22% entre aqueles que desenvolveram bacteremias por *S. aureus*. A letalidade atribuída à infecção hospitalar da corrente sanguínea (IHCS) foi de 45,07%. A IHCS acarretou, por si só, uma alta taxa de letalidade, independentemente da causa de internação, sem, contudo, aumentar significativamente o tempo de permanência hospitalar.

Além das infecções hospitalares provocadas por MRSA, a ocorrência de casos na comunidade também é um problema, principalmente em usuários de drogas intravenosas. As infecções de MRSA adquiridas por pessoas que não foram hospitalizadas recentemente (nos últimos 12 meses, por exemplo) nem se submeteram a qualquer procedimento médico invasivo (tais como diálise, cirurgia, cateter, etc) são ditas infecções comunitárias (CENTER FOR DISEASES CONTROL - CDC, 1996). Os *Staphylococcus* estão entre os agentes etiológicos mais freqüentemente associados a infecções bacterianas comunitárias. As infecções de MRSA na comunidade são manifestadas desde simples infecções da pele até graves doenças invasivas (RICARDO, 2004).

2.1.3. Evolução da resistência antibiótica em *Staphylococcus*

A resistência dos *Staphylococcus* à penicilina, oxacilina/meticilina ou vancomicina é uma conseqüência inevitável da pressão seletiva exercida pelos antibióticos. O aparecimento de novas classes de antimicrobianos surgiu normalmente em paralelo com a emergência de novas cepas resistentes de estafilococos.

Após o sucesso inicial da penicilina no tratamento de infecções por *S. aureus*, o surgimento de cepas *S. aureus* resistentes à penicilina (RAMMELKAMP & MAXON, 1942) tornou-se a principal ameaça em ambientes hospitalares na década de 50. Em poucos anos, 25,0% das cepas isoladas em infecções hospitalares já eram resistentes à penicilina, com registro de prevalências tão altas quanto 85,0% a 90,0%

em diversos hospitais no início dos anos 60. A partir de então, passou-se a utilizar a meticilina e drogas relacionadas para o tratamento das infecções causadas por *S. aureus*.

O uso indiscriminado da meticilina proporcionou a emergência de cepas *S. aureus* resistente a então recém-sintetizada penicilina beta-lactamase estável (*celbenin*) precursora do grupo da meticilina e oxacilina (JEVONS, 1961). Ficou conhecido como MRSA ou ORSA, embora clinicamente a oxacilina (e nafcilina em alguns países) tenha se estabelecido como a principal droga do grupo para uso clínico. O MRSA tornou-se importante causa de infecção hospitalar no início da década de 70, quando foram descritos os primeiros surtos (BARRET et al., 1968; O'TOOLE et al., 1970, PARKER & HEWITT, 1970). À partir de 1975, foram registrados vários surtos de MRSA em diversas instituições nos EUA, tornando-se endêmicos em diversos ambientes hospitalares (BOYCE, 1991; STAMM & LONG, 1993) e sendo responsáveis pela elevação nas taxas de infecção nosocomial.

Em decorrência da disseminação das cepas MRSA e de sua tendência à multirresistência, as opções terapêuticas para essas infecções limitaram-se, durante muito tempo, aos glicopeptídeos, principalmente a vancomicina (as cepas MRSA apresentam geralmente resistência à maioria dos antimicrobianos com atividade antiestafilocócica atualmente disponíveis, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, lincosamídeos, macrolídeos, quinolonas e tetraciclina). Desta forma, a vancomicina tornou-se uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas MRSA (CHAMBERS, 1997; LOWY, 1998, OLIVEIRA et al., 2000). No entanto, o aumento no uso de vancomicina conduziu para o *Enterococcus* resistente à vancomicina (NOBLE et al., 1992; DALLA COSTA et al., 1998) e depois para o *S. aureus* com sensibilidade intermediária aos glicopeptídeos (GISA) (HIRAMATSU et al., 1997b).

Os primeiros registros de um isolado clínico de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina ocorreram em meados da década de 90 (HIRAMATSU et al., 1997a; HIRAMATSU et al., 1997b). A concentração inibitória mínima relatada para este isolado estava em uma escala intermediária (MIC=8 µg/mL) de acordo com os critérios definidos pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, 2002). A partir deste primeiro registro, a emergência de isolados com resistência intermediária a vancomicina (VISA) avançou progressivamente entre os *S. aureus* (HIRAMATSU, 1998; SMITH et al., 1999; FRIDKIN, 2001; HIRAMATSU &

MAMIZUKA, 2001; OLIVEIRA et al., 2001). Além do VISA, já foram descritos isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativa com resistência intermediária à vancomicina (VICoNS) (DEL'ALAMO & HUBAND, 1999).

O surgimento de resistência completa de *S. aureus* à vancomicina (VRSA) foi relatada pela primeira vez em 2002 (CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDCP, 2002). O VRSA foi obtido de um paciente internado com diabetes, doença vascular periférica, e deficiência renal crônica. A MIC deste isolado para a vancomicina foi de 32 µg/mL. O isolado continha o gene de resistência a vancomicina *vanA* de enterococci, o qual é consistente com o perfil do MIC para os glicopeptídeos. Também apresentava o gene *mecA* de resistência a oxacilina.

O ocorrência de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina redundam em cepas de *Staphylococcus* que são resistentes a todos os antibióticos em uso atualmente. Isto porque a vancomicina é um antibiótico de última geração para várias infecções por bactérias gram-positivas, representando assim um dos últimos recursos para tratar estafilococos multirresistentes. Apesar disto, a resistência a vancomicina é um problema crescente, particularmente em ambientes hospitalares (MELO et al., 2005). Estes fatos, aliado a possibilidade de disseminação dessas cepas VRSA, representam uma grave ameaça à saúde pública, podendo levar ao indesejado, retorna a época quando as infecções bacterianas eram em sua maioria fatais.

2.1.4. Mecanismo de ação antibiótica e determinante genético da resistência.

O mecanismo de ação dos antibióticos e a resistência apresentada por microrganismos são temas que, freqüentemente, apresentam mudanças e, algumas vezes, não são completamente elucidados. A ação dos antibióticos sobre os microrganismos provoca dois tipos de efeitos, desde que o microrganismo seja sensível ao antimicrobiano: a morte do microrganismo (efeito bactericida) ou a inibição no seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático). Estes efeitos variam de acordo com a concentração do antimicrobiano no local onde se encontra o microrganismo. Teoricamente seria possível obter a concentração bactericida de qualquer antibiótico. Entretanto, na prática médica as concentrações dos antibióticos

são dependentes de algumas variáveis (absorção, distribuição, toxicidade para o hospedeiro) (TAVARES, 1996).

A realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos tem grande importância (SOUZA & ITO, 1993), entretanto, conhecimentos sobre fisiologia bacteriana e farmacologia do antimicrobiano a ser utilizado são ferramentas necessárias para que a antibioticoterapia seja aplicada (KONEMAN et al., 2001). Um microrganismo é resistente a um determinado antimicrobiano quando ele é capaz de crescer “in vitro” na concentração que esta droga atinge no sangue. O conceito de resistência e sensibilidade está intimamente associado à concentração que o antibiótico ou quimioterápico atinge no local de sua ação (TAVARES, 1996). A resistência natural faz parte das características biológicas dos microrganismos e pode ser observada em determinadas espécies bacterianas em relação a diferentes antimicrobianos. Esta resistência pode existir devido à falta de estrutura alvo ou o microrganismo pode ser impermeável a determinado antibiótico. Este tipo de resistência é previsível e tem importância clínica menor devido à multiplicidade de substâncias químicas atualmente disponíveis para tratamento de infecções bacterianas (KONEMAN et al., 2001).

A resistência adquirida a antibiótico é a habilidade adquirida por um microrganismo para resistir aos efeitos deste, para o qual ele é normalmente sensível e atualmente é descrita em praticamente todas as espécies bacterianas. Este tipo de resistência é mais importante que a natural devido à crescente participação de microrganismos portadores da mesma gênese de quadros clínicos infecciosos. Como consequência ocorre o agravamento destas infecções e elevação do custo do tratamento (FILE JR., 1999; JACOBY & ARCHER, 1991; TAVARES, 1996).

Os antibióticos não parecem ser agentes mutagênicos, portanto, não são causa direta do surgimento de resistência, eles apenas selecionam os microrganismos resistentes que existem em uma população bacteriana. Entretanto, os antibióticos podem ter a capacidade de induzir resistência em determinadas espécies bacterianas. Este fenômeno é observado em estafilococos, no qual ocorre produção da enzima β -lactamase, induzida pela presença dos antibióticos β -lactâmicos. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é decorrente de alterações genéticas que se expressam bioquimicamente. Estas alterações genéticas são frutos de mutação em genes cromossomais e aquisição de

genes de uma célula doadora através de mecanismos de troca de material genético (ATLAS, 1997; KONEMAN et al., 2001).

As bactérias possuem um número considerável de mecanismos genéticos para a resistência antimicrobiana. Elas podem sofrer mutações cromossomais, expressar um gene de resistência latente, ou adquirir novo material genético. O processo de aquisição deste novo material genético pode ocorrer de várias formas: através de troca direta do DNA (por conjugação), através de um bacteriófago (transdução), do DNA do plasmídeo extracromossomal (por conjugação) ou por aquisição de DNA via transformação. A informação codificada neste material genético permite à bactéria desenvolver resistência através de três principais mecanismos: produção de uma enzima que inativará ou destruirá o antibiótico; alteração do sítio de ligação ao antibiótico para livrar-se da ação do antibiótico; ou prevenção do acesso do antibiótico ao sítio de ligação (SHLAES et al., 1997). É comum uma única cepa de bactéria localizada em um hospital possuir vários destes mecanismos de resistência simultaneamente (NEU, 1992).

A resistência pode também ser adquirida por uma única mutação genética que pode ocorrer espontaneamente, tais como uma alteração no sítio alvo da DNA girase, a qual resulta em resistência a fluorquinolona. Outros mecanismos de resistência são mais complexos e consistem de genes que codificam a produção de enzimas altamente específicas que inativam vários antibióticos (por exemplo, os β -lactâmicos ou aminoglicosídeos). Há muita especulação sobre a origem destes genes. Alguns deles podem ocorrer naturalmente em outras espécies de bactérias (DAVIES, 1994). Postula-se que haja um *pool* substancial de genes de resistência a antibióticos (ou genes relacionados) na natureza (SHLAES et al., 1997).

Os transposons (também chamados genes “jumping”) e plasmídeos são dois meios disponíveis para a transferência de genes. A classe de transposons chamada *integrons* consiste de segmentos de DNA conservados que flanqueiam uma região central na qual podem ser inseridos cassetes que codificam funções de resistência a antibióticos. O segmento 5' conservado codifica uma recombinase ou integrase sítio-específica, bem como um ou mais promotores que asseguram a expressão do cassete de resistência integrada (STOKES & HALL, 1989; DAVIES, 1994).

Os transposons são capazes de mover-se de plasmídeos para o cromossomo bacteriano e vice-versa e também se inserir em bacteriófagos. Transposons conjugativos são capazes de induzir o processo de conjugação, transferindo material

genético de uma célula doadora para receptora (transferência horizontal de resistência) (KONEMAN et al., 2001). As primeiras cepas de *S. aureus* com resistência completa a vancomicina (VRSA) identificada nos EUA, continham o transposon Tn1546 carreando o gene *vanA* (CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDCP, 2002).

Os elementos transponíveis e os plasmídeos codificam não apenas a informação genética para a inativação de antimicrobianos, eles também podem codificar genes para o efluxo ativo de antibióticos da célula. O sistema de efluxo pode ser altamente específico para agentes antimicrobianos simples, ou pode envolver uma variedade de classes de agentes antimicrobianos. Inicialmente, acreditava-se que alguns casos de resistência eram devido a barreiras de permeabilidade, posteriormente descobriu-se ser mediadas pelas bombas do efluxo (LEVY, 1992; NIKAIDO, 1994).

A resistência à penicilina é observada atualmente de maneira universal, tanto em *S. aureus* como em estafilococos coagulase negativos (ARCHER & CLIMO, 1994). A aquisição de resistência está relacionada principalmente à transdução de plasmídeos que codificam a produção de enzimas inativadoras de penicilinas (β -lactamases). As enzimas β -lactamases produzidas por estafilococos são induzidas pela exposição à penicilina G e compostos correlatos, entretanto não é ativa contra cefalosporinas e penicilinas resistentes à penicilinase (metecilina, oxacilina, cloxacilina), a não ser quando produzidas em grande quantidade (MCDUGAL & THORNSBERRY, 1986; JACOBY & ARCHER, 1991; KONEMAN et al., 2001).

Embora alguns casos de resistência por alteração dos sítios alvos seja devido a mutações simples, como ocorre com fluorquinolonas e rifampicinas, as alterações de sítio alvo para resistência aos β -lactâmicos são bem mais complexos (SHLAES et al., 1997). Penicilinas, cefalosporinas e outros β -lactâmicos agem pela inativação de um número de transpeptidases (ou proteínas ligadas a penicilinas (PBPs)) essenciais para as reações de ligação na síntese da parede celular (SPRATT, 1994).

A emergência de resistência pode ocorrer gradualmente com acumulação gradual de substituições múltiplas de aminoácidos através de mutações. No entanto, há também evidências que suportam a tese da aquisição de genes de baixa afinidade em *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis* por recombinação com espécies de *N. comensais*. No caso da resistência à metecilina em *S. aureus*, um novo PBP 2' ou

gene *mecA* foi adquirido por *Staphylococcus*. Este novo gene *mecA* é parte de um transposon (SHLAES et al., 1997).

O mecanismo molecular de resistência aos β -lactâmicos (oxacilina/meticilina) das cepas MRSA resulta da integração, em sítio específico, do elemento genético móvel de 26 Kb a 67 Kb no genoma do *S. aureus* meticilina-sensível. Esse elemento genético é denominado *SSCmec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*), que contém o gene *mecA* e seus reguladores. O gene *mecA* codifica a produção de proteínas ligadas à penicilina (PBP2a ou PBP2 – protein binding penicilin) alteradas, e que possuem baixa afinidade aos antibióticos β -lactâmicos. As PBPs fazem parte da membrana citoplasmática de estafilococos e atuam como enzimas no processo de síntese da parede celular. Tais proteínas constituem os receptores aos quais as penicilinas se ligam para exercer seu mecanismo de ação (HARTMAN & TOMASZ, 1984; MALOUIN & BRYAN, 1986).

Assim, a resistência a oxacilina/meticilina, conferida pelo gene *mecA*, resulta em resistência cruzada a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Além da resistência aos β -lactâmicos, o *SSCmec* atua como uma “armadilha” para genes adicionais de resistência, permitindo a integração de transposons e plasmídeos no cassete cromossômico. A maioria dos MRSA hospitalares pode ser classificada em três tipos de *SSCmec*: I, II ou III, que se diferenciam com base no tamanho e na sua composição genética (RICARDO, 2004).

Os determinantes de resistência adquirida à vancomicina *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanF* e *vanG* foram identificados e obtidos de VRE (*Enterococcus faecali* resistente a vancomicina), e antes da identificação do primeiro caso de VRSA, estes genes ainda não haviam sido identificados em isolados clínicos de *S. aureus* (WOODFORD, 2001). Entretanto, a transferência conjugativa do gene *vanA* de *Enterococcus* para *S. aureus* já havia sido demonstrada *in vitro* (NOBLE et al., 1992). A presença do gene *vanA* nos isolados VRSA, sugere que o determinante da resistência certamente foi adquirido através de troca do material genético de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDCP, 2002).

As bactérias têm evoluído em uma série de mecanismos para tornar-se resistentes aos antimicrobianos, e uma vez que os tenha adquirido, são hábeis na disseminação da resistência. O estudo de organismos da era pré-antibiótica sugere que a evolução dos plasmídeos R multirresistentes tem ocorrido nos últimos 50 anos,

coincidindo com o período em que ocorreu a descoberta e o uso cada vez mais difundido de agentes antimicrobianos. É pouco provável que a associação entre estes dois fenômenos temporariamente relacionados seja apenas casual (SHLAES et al., 1997).

2.1.5. Métodos tradicionais, comerciais, bioquímicos e moleculares na tipificação e caracterização de *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* pode produzir uma variedade de proteases, nucleases e lipases que atuam despolimerizando, respectivamente, proteínas, ácidos nucléicos e gorduras. Estas enzimas propiciam maior poder invasivo às bactérias que as produzem.

Staphylococcus sp, 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, pirrolidonil arilamidase (PYR), DNase, produção de urease, β -galactosidade, produção de acetoina, resistência a novobiocina, resistência a polimixina B, catalase, produção de ácido a partir de uma variedade de carboidratos, tais como trealose, manitol, manose, turanose, xilose, celobiose, maltose e sacarose (BANNERMAN, 2003).

O diagnóstico laboratorial dos *S. aureus* é realizado, através da bacterioscopia e da análise das características culturais das colônias e da hemólise em meio de cultura como o agar sangue. Vários meios seletivo-indicadores, entre os quais se inclui o agar manitol-salgado, podem ser empregados com a finalidade de isolamento. Para diferenciá-los das outras espécies, é necessário o teste de produção de coagulase (KONEMAN et al., 2001).

Muitas cepas de *S. aureus* apresentam uma coagulase ligada ou “fator clumping” na superfície da parede celular. Este fator reage diretamente, com o fibrinogênio no plasma, causando rápida aglutinação da célula. A pesquisa de “fator clumping” não deve ser a prova de escolha para caracterizar *S. aureus*, pois usualmente cepas deficientes deste fator produzem coagulase livre, que é pesquisada no teste de coagulase em tubo. A chamada coagulase livre é secretada extracelularmente e reage com uma substância no plasma chamada “fator de reação

da coagulase” (FRC), formando um complexo que reage com o fibrinogênio com subsequente formação de fibrina (MADIGAN et al., 1997).

A coagulase livre e conjugada atua formando uma película envolvente ao redor da célula bacteriana, fornecendo proteção contra opsonização, fagocitose e dificultando a atuação de agentes antimicrobianos. Por outro lado, a formação desta película pode limitar a infecção a um determinado local. Fibrinolisinias produzidas por *S. aureus* podem, lisar esta fibrina e permitir que a infecção se espalhe para os tecidos adjacentes (MADIGAN et al., 1997).

A produção de catalase por este organismo tem a função de invadir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), composto tóxico que é produzido dentro de células fagocíticas após a fagocitose do microrganismo. Como produto da ação desta enzima sobre o peróxido de hidrogênio ocorre à formação de substâncias que não são nocivas (água e gás oxigênio).

Outra prova de interesse clínico é a dextrorribonuclease (DNase), prova recomendada para a caracterização de *S. aureus*. ARCHER (1994) sugeriu que podia ser utilizada a atividade de DNase para identificar esta espécie, depois de estabelecer elevada correlação com a produção de coagulase.

Vários “Kits” comerciais estão disponíveis no mercado, 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 e Pos Combo tipo 6 e Rapid Pos Combo tipo 1 (Date 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).

Vários métodos bioquímicos e moleculares têm sido usados na tipificação e caracterização de linhagens em sistemas bacterianos e epidemiológicos, como sorotipagem, tipificação de antígenos monoclonais, resistotipagem, eletroforese de células, de diversas proteínas incluindo as de membrana, e vários tipos de carboidratos e lipídios, incluindo também a fagotipagem, teste de sensibilidade a antimicrobianos, biotipagem, perfis plasmídicos e cromossômicos com endonucleases de restrição e ribotipagem (SELANDER et al., 1986; KAPUR et al., 1995).

A identificação baseada nos métodos moleculares tem crescido significativamente nesta última década, devido à rapidez e precisão de diagnóstico.

MARTINEAU et al. (1998) desenvolveram a técnica molecular denominada reação em cadeia da polimerase (PCR) de fácil execução para diagnóstico rápido de *S. aureus* através da amplificação de fragmentos de DNA cromossômico. A reação de PCR baseia-se no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeo utilizado como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação, de maneira que as seqüências de nucleotídeos sejam complementares à seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, pareamento e extensão (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Outros métodos, baseados nas características genóticas, têm sido desenvolvidos. Segmentos de genes que, embora polimórficos, apresentam estabilidade suficiente para permitir discriminação de isolados não relacionados, podem ser amplificados e os seus produtos analisados (DOLZANI et al., 1994). Neste sentido, métodos de epidemiologia molecular baseado na heterogeneidade genética têm dado resultados promissores, quando se estuda a epidemiologia de doenças infecciosas (MASLOW et al., 1993; VAN BELKUM et al., 1996). A análise do perfil plasmidial foi a primeira técnica baseada em DNA para rastreamento epidemiológico (MASLOW et al. 1993).

Um método derivado do PCR desenvolvido por WILLIAMS et al. (1990), tem despertado atenção por causa da extrema simplicidade e pela quantidade mínima de DNA necessário. Na técnica denominada RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), o DNA genômico é amplificado em fragmentos únicos ou múltiplos (MICHELI et al., 1994) e os polimorfismos entre amostras são detectados como diferenças entre fragmentos amplificados do DNA genômico.

O RAPD, também conhecido como *Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*, é uma variação da técnica de PCR. Esta técnica é baseada no uso de *primers* de seqüências curtas, geralmente 10 bases, escolhidas aleatoriamente (randomicamente), ou seja, a seqüência alvo não é determinada. Deste modo, a seqüência compreendida entre dois *primers* hibridizados é amplificada arbitrariamente. Em outras palavras, os produtos da PCR terão tamanho correspondente à distância entre dois *primers*. O número e localização destas seqüências variam em diferentes cepas de uma espécie bacteriana. Após a separação eletroforética dos produtos amplificados, um padrão de bandas (*fingerprint*) é gerado e que, teoricamente, é característico dos produtos, é necessário

de uma cepa bacteriana em particular. O padrão de bandas gerado pode ser visualizado sob iluminação ultravioleta após adição de brometo de etídio. Uma única substituição de bases, inserções ou deleções pode alterar o anelamento do iniciador, tendo como consequência padrões de bandas diferentes (POWER, 1996; TENOVER et al., 1997; OLIVE & BEAN, 1999). Assim, os estudos que já ocorriam com microrganismos clássicos foram acelerados e possibilitaram também análises genéticas em espécies anteriormente não contempladas.

Uma das vantagens do RAPD é a pequena quantidade de DNA necessária para sua realização, uma vez que partes deste DNA serão amplificadas por PCR, ao contrário do PFGE (*Pulsed-Field Gel Eletrophoresis*) onde não há amplificação e grande quantidade e pureza do DNA são exigidas. Este fato é especialmente importante quando se trabalha com bactérias Gram positivas, uma vez que a composição de suas paredes dificulta a extração e purificação do DNA (DAUTLE, et al., 2002).

O poder discriminatório para *Staphylococcus* é menor do que PFGE, entretanto, para avaliações epidemiológicas de pequenos surtos, o RAPD é considerado uma valiosa ferramenta para caracterização inicial das cepas envolvidas no surto. Alguns trabalhos relatam completa correlação entre os resultados do PFGE e RAPD (OLMOS et al., 1998; CETINKAYA et al., 2000; STRANDÉN et al., 2003). Com a intenção de aumentar o poder discriminatório pode-se combinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos com a técnica RAPD (BARTZAVALI-LOUKI et al., 2003).

Diversos iniciadores podem ser utilizados na reação do RAPD. A combinação de dois ou mais, em geral, resulta em um número maior de bandas o que conseqüentemente pode melhorar o poder discriminatório da técnica. Pode-se também combinar os resultados obtidos pela utilização de um único iniciador com os resultados da utilização de combinações de iniciadores (FUNG et al., 2001).

Durante a última década, um grande número de novas técnicas de tipagem tem sido desenvolvido para serem aplicadas em estudos epidemiológicos de uma grande variedade de microrganismos hospitalares. Os métodos de tipagem de patógenos, quando usados de modo racional e apropriado e em conjuntos com dados epidemiológicos tem facilitado o trabalho dos clínicos e dos epidemiologistas hospitalares (BERETTA, 2004).

3. OBJETIVOS

- Avaliar a diversidade genética entre as diferentes cepas isoladas de portadores humanos (médicos, estudantes, auxiliares de enfermagem e pacientes) e cabeceira de cama, através da técnica de RAPD-PCR,
- Verificar a existência de correlação entre os diferentes genótipos obtidos em um hospital universitário de Ribeirão Preto/SP,
- Investigar a variabilidade encontrada em diferentes isolados de *Staphylococcus* coagulase-positiva e coagulase-negativa obtidos tanto de amostras de mãos de pessoal da saúde como de camas, visando correlacionar as diferentes populações encontradas,
- Analisar o perfil de resistência a diferentes antimicrobianos de uso comum na prática médica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 143 amostras provenientes das mãos direitas de: auxiliares de enfermagem (E), médicos (M), de pacientes internados (P), de alunos do curso de medicina do 5º ano (A) e de cabeceiras de camas (C) dos pacientes internados no setor de Ginecologia e Obstetrícia de um Hospital Escola de Ribeirão Preto/SP. Essas coletas foram realizadas em média uma vez por semana no período de aproximadamente um ano (24/04/2005 a 28/08/2006). O projeto foi aprovado pela Comissão de ética (Anexo 1) e todos os participantes assinaram termo de consentimento para a colheita de seu espécime clínico e os resultados foram comunicados à chefia do setor.

4.1. Coleta e isolamento das amostras

As amostras foram coletadas através de suabes estéreis (cotonetes) com movimentos circulares na palma da mão direita de cada pessoa e da mesma forma foram coletadas das cabeceiras de camas do hospital. Estes foram colocados dentro de tubos de ensaio contendo 1,0 mL de BHI - Brain Heart Infusion Broth (Difco) e trazidos ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP de Jaboticabal, onde foram incubados a 37º C por 24 horas. Após este período, a cultura foi retirada com alça de platina e semeada em placas de Petri contendo “ágar *Staphylococcus* Médiu 110” (Difco), seletivo para o isolamento de *Staphylococcus*. O inóculo foi novamente incubado a temperatura de 37º C por 24 horas.

4.2. Identificação das amostras

4.2.1. Coloração de Gram

As colônias suspeitas de pertencerem ao gênero, com pigmentação branca ou amarela e com colônias brilhantes, formadas sobre o meio de cultura foram feitos esfregaços e corado pelo método de Gram para observação de suas características morfológicas. As colônias típicas do gênero *Staphylococcus* foram colhidas com alça de platina e transferidas para tubos de hemólise contendo 2 mL de ágar BHI. Esses tubos foram colocados em estufa a 37° C por 24 horas.

4.2.2. Provas bioquímicas

As colônias com características morfológicas positivas para o gênero foram submetidas a testes de identificação bioquímica por meio das provas de catalase, manitol, hemólise, DNase e coagulase.

4.2.2.1. Prova da catalase

Para a pesquisa da produção de catalase foram depositadas sobre uma lâmina de microscopia limpa e seca uma gota de água oxigenada a 10% e uma alçada da cultura retirada do ágar BHI. A liberação de gás, com formação de bolhas foi considerado resultado positivo. Para melhor visualização deste processo, as lâminas foram colocadas sobre um fundo escuro (PALAZZO, 2000).

4.2.2.2. Prova da fermentação do manitol

As colônias positivas ao teste da catalase foram repicadas em tubos de hemólise contendo 2 mL de Agar Sal Manitol (OXOID), distribuído de forma inclinada e, incubados por 24-48 horas em estufa a 37° C. A mudança da cor vermelha para a cor amarela foi considerada resultado positivo (PALAZZO, 2000).

4.2.2.3. Prova da hemólise

Três a quatro colônias foram semeadas em placa de Petri contendo Agar sangue de cavalo desfibrinado. As placas foram incubadas a 37° C por 24-48 horas. A formação de um halo transparente ao redor das colônias foi considerada resultado positivo (PALAZZO, 2000).

4.2.2.4. Prova da desoxiribonuclease (DNase)

A pesquisa de DNase foi feita utilizando-se uma alçada da cultura estoque repicada em placas de Petri contendo 20 mL de Agar Desoxyribonuclease (DNase Test Agar - BIOLIFE). Para cada placa foram semeadas quatro cepas e incubadas a 37° C por 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram inundadas por 5 mL de solução de ácido clorídrico 1N, visando a precipitação do DNA íntegro. As leituras foram realizadas após um período de 10 minutos. A formação de halo claro ao redor do ponto de semeadura, decorrente da hidrólise do DNA (nucleoproteína) por ação da enzima DNase, foi considerado resultado positivo (KONEMAN et al., 2001).

4.2.2.5. Prova da coagulase em tubo

A pesquisa da produção da enzima coagulase em tubo ou coagulase livre foi realizada pela técnica em tubo, segundo SPERBER & TATINI (1975). As cepas estocadas foram semeadas em tubos contendo 5 mL de ágar BHI inclinado e incubadas a 37° C por 24 horas. Após a incubação, cada amostra foi repicada para um tubo contendo 5 mL de caldo Muller-Hinton (OXOID) e incubada a 37° C por 24 horas. Após este período de incubação, os tampões de algodão dos tubos foram substituídos por rolhas de borracha esterilizadas e as cepas mantidas à temperatura ambiente. Foi utilizado 0,1 mL de plasma de coelho e colocado em tubo de hemólise juntamente com 0,4 mL de solução fisiológica 0,85% esterilizada. A cada tubo foi adicionado 0,5 mL da cultura semeada em caldo BHI, previamente homogeneizado. Estes tubos, após a homogeneização, foram colocados em banho-maria a 37° C. A

leitura foi efetuada após 1, 2, 4 e 24 horas de incubação. A formação de fibrina ou qualquer grau de coagulação foi considerado resultado positivo.

4.2.2.6. Prova da coagulase em lâmina

Sobre uma lâmina de microscopia, limpa e seca foram depositadas uma alçada da cultura e uma gota de plasma de coelho e misturadas. Uma reação positiva demonstrando a presença de coagulase ligada ou fator de aglutinação “fator de clumping” na superfície bacteriana foi indicada pela aglutinação das bactérias no intervalo de 1 minuto (QUINN et al., 2005).

4.3. Amostras de Referências Positivas

A amostra de referência positiva neste trabalho foi a cepa de *S. aureus* ATCC 6538 (Fundação André Tosello – Campinas/SP).

4.4. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

Todas as cepas de *Staphylococcus* sp isoladas foram testadas pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS 2002) para a susceptibilidade dos antimicrobianos de uso mais comum na prática médica de um Hospital Escola de Ribeirão Preto: oxacilina (10 µg), novobiocina (5 µg), cefazolina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ácido clavulânico+amoxicilina (30 µg), vancomicina (30 µg), azitromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), amoxicilina (10 µg), enrofloxacina (5 µg) e ampicilina (10 µg). Para a realização desses testes as cepas isoladas foram repicadas em tubos contendo 2 mL de caldo BHI e incubadas a 37° C por 6 a 8 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente três minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados os polidiscos (CECON - Centro de controle e produtos para diagnósticos Ltda)

contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37° C através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

4.5. Extração e Purificação do DNA genômico

O método de extração do DNA genômico foi realizado seguindo as recomendações do kit GFX Genomic Blood – DNA Purification Kit (GE Healthcare). A cultura bacteriana foi crescida inicialmente em 1,5 mL de meio de cultura BHI por 24 h a 37° C. Após incubação esta cultura foi centrifugada para a obtenção do material sedimentado. Ao sedimento foram adicionados 40 µL de tampão lisozima sob agitação em um “vortex” e logo em seguida foram adicionados 10 µL de lisozima (USB). A solução foi agitada, incubada e adicionada 10 µL de proteinase K (USB). Em seguida foi novamente agitada e incubada a 55° C por 15 minutos para inativar a DNase. Na seqüência de extração foi utilizado um tubo coletor acoplado a um filtro, onde foi adicionado 500 µL de solução de extração em duas etapas, seguindo-se a centrifugação à 8000 rpm por dois minutos e após este período foi adicionado 500 µL de solução de lavagem e submetido à rápida centrifugação à 8.000 rpm por dois minutos. O DNA foi ressuspendido com 200 µL de tampão TE (40mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM de EDTA) pré-aquecido a 70°C e centrifugado à 14.000 rpm por dois minutos. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotômetro em 260nm e 280 nm (DU-640B, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) e o DNA foi estocado em freezer –20° C até o momento do uso (SAMBROOK et al., 1989). As amostras de DNA foram diluídas com água milli-Q para que todas ficassem na mesma concentração necessária para a execução da técnica (50 ng/µL).

4.6. RAPD-PCR

A tipagem molecular das cepas de *Staphylococcus* foi realizada pelo método de RAPD (“RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA”) utilizando o Kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads (GE Healthcare), 10 ng de DNA (2,0 µL), e 18 µL de água Milli Q estéril para completar o volume final da reação de 25 µL. Tudo foi colocado em um microtubo contendo uma mistura liofilizada termoestável da enzima Taq DNA Polimerase (AmpliTaq™ DNA polimerase e fragmento Stoffel), dNTPs (0,4 mM de cada dNTP em 25 µL de tampão), BSA (2,5 µg) e tampão [3 mM de cloreto de magnésio, 30 mM cloreto de potássio e 10 mM Tris], (pH 8.3) para um volume de reação de 25 µL fornecidos pelo Kit .

As reações de amplificação foram feitas em um termociclador (Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR System 9700) programado para 45 ciclos de um minuto a 95º C, um minuto a 36º C e dois minutos a 72º C, seguidos de uma etapa de extensão final de cinco minutos a 72º C.

4.7. Eletroforese em gel de agarose

Os “amplicons” foram separados por eletroforese em cuba horizontal (GE Healthcare) em gel de agarose (GE Healthcare) a 2%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2) durante três horas a 150 volts. Os produtos da amplificação (5 µL) foram misturados com 1,0 µL de tampão (glicerol 30%, EDTA 100mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,30%) e aplicados em gel de agarose. Foi utilizado 4 µL (100 µL de ladder, 350 µL de TE e 50 µL load 10X) de padrão de tamanho molecular 100pb “Ladder” (GE Healthcare). Os “amplicons” foram corados com brometo de etídeo (GE Healthcare), visualizados em transluminador-UV (SYNGENE - Cambridge, Reino Unido) e fotodocumentados através de câmera digital (SYNOPTICS) e do “software” Gene link (SYNGENE).

4.8. Análise de similaridade

Por meio da análise do bandeamento produzido com o oligonucleotídeo iniciador aleatório, foi conferido o parâmetro um (1) para a presença de banda e zero (0) para a ausência de banda, permitindo a elaboração de uma matriz binária. Essa matriz, utilizada para a construção de um filograma pelo “software” FreeTree Win 95/98/NT (HAMPL et al., 2001). A similaridade genética entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de distância descrito por NEI (1986). Para o agrupamento dos dados da matriz filogenética foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA - Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages) (SNEATH & SOKAL, 1973) sendo que o filograma foi obtido com o auxílio do “software” TreeView (PAGE, 1996).

4.9. Análise estatística

Para a análise dos resultados utilizou-se a distribuição do Teste Qui-quadrado (χ^2), usado para determinar se as diferenças observadas entre as cepas coagulase positivas e as cepas coagulase negativas de *Staphylococcus* sp foram significativas. Adotando um nível de significância de $P \leq 0,05$ (OLIVEIRA et al., 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas provas bioquímicas foram identificadas 92 cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de 143 amostras coletadas de mãos de pessoal e camas de um Hospital Escola, sendo, 67 (72,8%) de *S. coagulase* negativas e 25 (27,2%) *S. coagulase* positivas (Tabela 1).

BRAIOS (2005) em estudo realizado com 100 funcionários de um Hospital Universitário de Presidente Prudente/SP observou que 32,0% dos trabalhadores eram portadores de *S. coagulase* positiva, percentual semelhante com o do presente trabalho, onde 33,3% (não apresentados) dos funcionários foram considerados portadores de *S. coagulase* positiva e quando consideramos os *S. coagulase* negativa (66,7%), esse percentual aumenta significadamente e analisando os *Staphylococcus* sp, de uma forma geral, os valores são ainda mais superiores (73,4%) que os portadores são encontrados no estudo citado acima.

Todos os resultados submetidos ao Teste Qui-quadrado (χ^2), foram considerados significantes estatisticamente ($P=0,03$), existindo assim, diferenças na prevalência das amostras coletadas dos diversos locais e diferenças também na prevalência analisada entre os dois grupos de *Staphylococcus* sp, o *coagulase* positiva e o *coagulase* negativa.

Tabela 1. Número e porcentagem de cepas de *Staphylococcus* *coagulase* positivas e negativas isoladas de 143 amostras de origem humana e de camas de um Hospital Escola.

ORIGEM	AMOSTRAS COLETADAS	CEPAS ISOLADAS	TESTE DE COAGULASE			
			+	%	-	%
Cabeceiras de camas	49	23	2	8,7	21	91,3
Mãos de alunos	5	4	2	50,0	2	50,0
Mãos de aux. enferm.	26	15	5	33,3	10	66,7
Mãos de médicos	4	3	1	33,3	2	66,7
Mãos de pacientes	59	47	15	31,9	32	68,1
TOTAL	143	92	25	27,2	67	72,8

Aux. de enferm.= Auxiliar de enfermagem.

Os resultados foram significativos pelo "Teste Qui-quadrado", $P=0,03$.

Conforme os dados contidos na tabela acima pode-se observar que o número de cepas de *S. coagulase negativa* (n=67) e *S. coagulase positiva* (n=25) isolados das palmas das mãos e cabeceiras de camas, apesar de apresentarem diferenças, vêm confirmar a positividade desse microrganismo nas mãos, sendo semelhante aos resultados obtidos por OLIVEIRA SANTOS (2000), analisando portadores de *S. aureus* isolados de mãos, onde ficou demonstrada a possibilidade de propagação dessa bactéria através das mãos de pacientes infectados para outros suscetíveis e vice-versa, como também de enfermeiros para pacientes suscetíveis.

Das amostras colhidas de mãos de médicos, enfermeiros, estudantes e pacientes a maior freqüência de *Staphylococcus coagulase positiva* foi encontrada em mãos de pacientes (n=15) e a menor de mãos de médicos (n=1). O número de amostras colhidas das mãos dos médicos foi muito menor que as de pacientes. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em estudo realizado em portadores são com pessoal de diferentes categorias de enfermagem do Hospital das Clínicas da FM-USP em Ribeirão Preto-SP (OLIVEIRA SANTOS, 1999). Com relação às amostras colhidas de camas, foram isoladas duas cepas de *Staphylococcus coagulase positivas*. Essa freqüência se deve possivelmente ao fato dos auxiliares de enfermagem e até mesmo os pacientes do hospital rotineiramente colocarem as mãos sobre as cabeceiras das camas. O maior percentual de cepas de *Staphylococcus coagulase negativa* foi verificado nas mãos de pacientes e a menor nas mãos de enfermeiros (Tabela 1).

As cepas de *Staphylococcus sp*, principalmente as resistentes a metilina são introduzidas em um hospital por meio de pacientes colonizados ou de indivíduos da equipe de trabalhadores hospitalares (MULLIGAN et al., 1993). As narinas e as mãos são os principais reservatórios de *S. aureus* e a transmissão ocorrem principalmente através de contato direto e também por equipamentos e utensílios contaminados, uma vez que, essas bactérias são bem resistentes às condições ambientais. Assim sendo, quando introduzidas e disseminadas em um hospital, dificilmente são erradicadas desse ambiente (DIAS et al., 1997). WAGENVOORT et al. (2000) encontraram cepas MRSA em 26,0% dos teclados de computadores e 15% das torneiras dentro de uma UTI, demonstrando ampla contaminação ambiental. No presente trabalho observou-se um alto percentual de cepas de *Staphylococcus sp* em cabeceiras de camas de pacientes internados, sendo 8,7% coagulase positiva e 91,3% coagulase negativa (Tabela 1).

KLUYTMANS et al. (1997), demonstraram que 20,0% dos trabalhadores hospitalares eram carreadores persistentes de *S. aureus*, enquanto, VANDENBERGH et al. (1999) também encontraram um percentual significativo (36,0%) de indivíduos carreando de modo persistente esse microrganismo.

OLIVEIRA SANTOS (1999) em estudo sobre portadores sãos de *S. aureus* isolados de 42 alunos de um curso de auxiliar de enfermagem do Centro Interescolar (HCFMRP-USP), com duração de um ano, com atividades teóricas e práticas, demonstrou que a freqüência das amostras positivas para *S. aureus* coletadas das mãos direita foi de 26,8% para os alunos sem atividade prática e 28,2% para os alunos com atividade prática. Comparando esses resultados com o do presente estudo, foi observado um percentual maior, 50,0% das cepas isoladas de alunos do curso de medicina foram positivos para o teste de coagulase. Esta diferença pode ser devido ao fato dos alunos do presente estudo já terem atividade prática por serem do quinto ano, portanto esses alunos tiveram maior permanência dentro do hospital.

Logo em seguida à cavidade nasal, as mãos têm sido a área anatômica com maior colonização freqüentemente positiva para *S. aureus*, na maioria dos adultos, sendo que este local de colonização é que garante a colonização da superfície cutânea (SANTOS, 1999). A recomendação para a freqüência positiva para *S. aureus* seria lavagem adequada das mãos, utilização de máscaras, luvas e a troca das mesmas à medida que auxiliares de enfermagem, médicos e alunos tivesse contato com os pacientes, pois ficou demonstrado neste estudo um percentual alto para a freqüência de *Staphylococcus* coagulase positivo, 50,0% isolados das mãos dos alunos, 33,3% dos médicos e 33,3% em auxiliares de enfermagem.

KOTILAINEN et al. (2003) identificaram nos países escandinavos que menos de 1,0% dos *S. aureus* isolados em pacientes hospitalizados apresentam resistência à metilicina. Assim os pesquisadores enfatizam a necessidade de adoção permanente de medidas rígidas para a prevenção de infecções por cepas MRSA, tais como a educação contínua dos funcionários hospitalares, o isolamento de pacientes infectados por cepas resistentes, acompanhamento de pacientes e funcionários expostos a indivíduos infectados, eliminação das cepas em portadores entre outras medidas.

Após a obtenção das amostras de DNA e análise pela técnica de PCR-RAPD das 92 cepas de *Staphylococcus* sp, os resultados das ampliações com um iniciador, apresentou resultado satisfatório (número de bandas amplificadas por

amostra: ≥ 2), podendo observar padrões genotípicos de 2 a 10 bandas e fragmentos com tamanhos de 200 a 2072 pb, de acordo com o padrão molecular 100 pb “Ladder” (Figura 1).

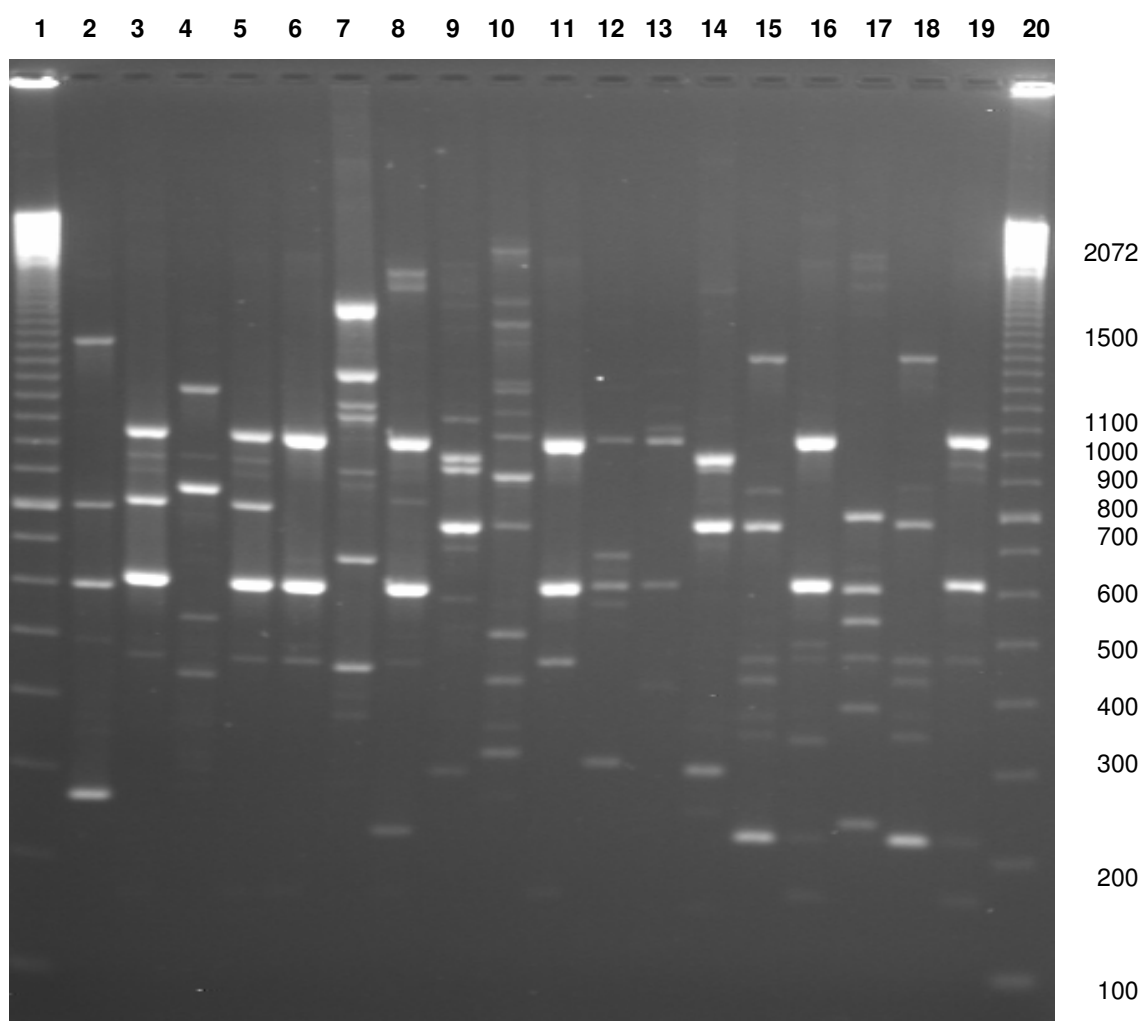


Figura 1: Perfis dos produtos de amplificação das amostras de DNA de *Staphylococcus* sp com iniciador 5'-d[CCCGTCAGCA]-3' através de PCR-RAPD. Canaletas: 1-Marcador Molecular (100 pb “Ladder” da USB), 2- Amostra de Referência Positiva (ATCC 6538), 3-cama, 4-paciente, 5-paciente, 6-paciente, 7-paciente, 8-paciente, 9-paciente, 10-paciente, 11-paciente, 12-cama, 13-paciente, 14-paciente, 15-cama, 16-cama, 17-cama, 18-cama, 19-cama, 20-Marcador Molecular.

Utilizando o coeficiente descrito por NEI, os coeficientes variaram de 0,1 a 1,0 (Figura 2: escala/lado esquerdo) e os valores entre as 92 cepas mostraram grande dissimilaridade apesar de algumas cepas apresentarem entre si coeficiente igual a 1,0. Esses valores foram analisados e uma matriz de similaridade genética para todas as comparações par-a-par foi obtida e utilizada para construir um filograma (Figura 2) pelo critério do UPGMA como metodologia de agrupamentos.

A figura 2 mostra o filograma obtido a partir da matriz e uma grande heterogeneidade genética é demonstrada e algumas cepas apresentaram entre si similaridade de 100,0% entre os isolados. Neste filograma pode-se observar também a formação de cinco grupos ou “clusters” distintos de cepas de *Staphylococcus* sp (A, B, C, D e E). A similaridade entre esses grupos foi de aproximadamente 50,0%.

O grupo A, apresenta 41 ramificações sendo nove cepas de *Staphylococcus* sp coagulase positivas, incluindo o controle ATCC 6538 e 31 cepas de *Staphylococcus* sp coagulase negativas. Dentre os *S.* coagulase negativa aparecem duas cepas isoladas de cabeceiras de camas, outras duas provenientes de cama e mão de pacientes e duas isoladas de mãos de pacientes apresentando 100,0% de similaridade entre os pares. O grupo B apresenta 18 ramificações com seis cepas de *Staphylococcus* sp coagulase positivas e 12 de *Staphylococcus* sp coagulase negativas das quais três cepas, provenientes de pacientes, são 100,0% similares.

O terceiro grupo (C) com 24 ramificações das quais 13 cepas de *Staphylococcus* sp coagulase negativas apresentam similaridades e origens variadas e 11 cepas de *Staphylococcus* sp coagulase positivas, sendo duas isoladas de mãos de enfermeiros e três isoladas de mãos de pacientes demonstrando 100,0% de similaridade. Em estudo conduzido em pacientes de um hospital de Campinas/SP a análise da similaridade genética através do RAPD-PCR entre os isolados de *S. aureus* foi acima de 80,0% (BERETTA, 2004). O quarto grupo (D) apenas com três ramificações com cepas de *Staphylococcus* sp coagulase negativas, isoladas de mãos de pacientes, apresentam 50,0% de similaridade.

Por último, o quinto grupo (E), apresenta sete ramificações com cepas de *Staphylococcus* sp coagulase negativas, de origens variadas, uma cepa isolada de cama e outra de paciente e duas isoladas de camas que apresentam 100,0% de similaridade.

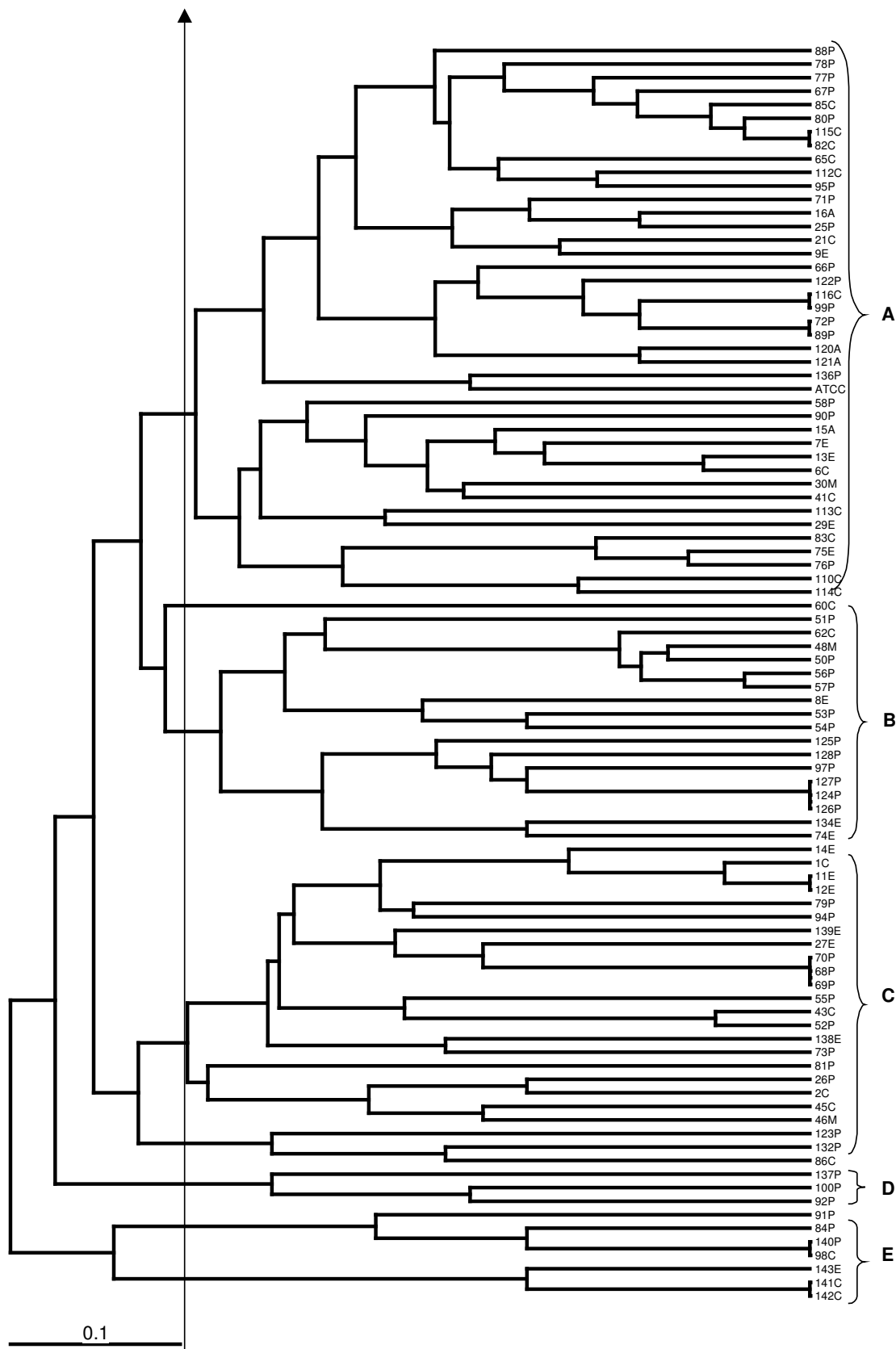


Figura 2: Filograma construído através do “software” FreeTree Win 95/98Nt, utilizando o coeficiente de distância DICE. Para o agrupamento da matriz foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA), sendo o filograma obtido com o auxílio do “software” TreeView.

Comparando as origens das cepas de *Staphylococcus* sp isoladas é possível observar uma maior similaridade entre as isoladas das mãos de alunos com 47,0%, seguida das isoladas das mãos dos médicos com 40,0% de similaridade, das mãos dos enfermeiros com 26,0%, das mãos de pacientes hospitalizados com 22,0% e por fim das cabeceiras de camas com 21,0%. Este fato mostra uma grande heterogeneidade genética das cepas isoladas.

Apesar de fornecer resultados mais rápidos e de ser considerada a técnica padrão para detecção de resistência, a técnica da PCR ainda é inacessível para a maioria dos laboratórios de análises clínicas, uma vez que, são necessários equipamentos de custo elevado. As infecções provocadas por cepas MRSA devem ser tratadas com outro grupo antimicrobiano, geralmente um glicopeptídeo. Assim, a diferenciação entre as cepas pode minimizar o uso de vancomicina e, dessa maneira, evitar a seleção de cepas de *S. aureus* e *Enterococcus* spp resistente a esse antimicrobiano, além de diminuir os custos do tratamento (LOWY, 2003).

A maioria das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas e coagulase negativas analisadas através da técnica de RAPD-PCR mostraram baixos índices de similaridade genética entre elas, fato também encontrado em estudo de diversidade genética de *S. aureus* isolados do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, onde os isolados foram analisados através da mesma técnica tendo sido encontrado entre os dois grupos similaridade genética de 37,0% (MELO et al., 2005).

CASEY et al. (2006) em estudos para diferenciação entre a técnica de RAPD ou PFGE como a melhor ferramenta de biologia molecular para auxiliar no diagnóstico epidemiológico de cepas de *S. coagulase* negativa, concluiu que a técnica de RAPD tem um poder discriminatório satisfatório, é mais rápido, sendo possível o resultado em 4 horas para a caracterização clínica de microrganismos envolvidos em infecção hospitalar.

O RAPD é considerado uma alternativa para a caracterização inicial de cepas de *S. aureus* isoladas em uma determinada instituição, apresentando poder discriminatório razoavelmente bom, rapidez e menor custo. TENOVER et al. (1997) salientam que a técnica PFGE é o método de referência para a tipagem de *S. aureus*. No entanto, o mesmo autor recomenda a utilização do RAPD como técnica alternativa, quando a técnica de referência (PFGE) não está disponível ou quando se tem como objetivo a discriminação de um grupo de isolados.

No Brasil, MELO et al. (2005), analisaram 41 pacientes do Hospital das Clínicas de Universidade Federal de Uberlândia (MG) e verificaram a presença de *S. aureus* resistentes à vancomicina. A análise molecular destas amostras através de RAPD-PCR revelou diversidade genética do *S. aureus* resistente a vancomicina, mostrando dois “clusters” com relação temporal espacial e com perfil de susceptibilidade semelhante quando frente a vários outros antimicrobianos.

Vários autores obtiveram bons resultados utilizando a técnica RAPD em estudos epidemiológicos. Alguns estudos apresentaram resultados similares na tipagem utilizando PFGE e RAPD (TAMBIC et al., 1997; OLMOS et al., 1998; FUNG et al., 2001; KONDOH et al., 2002).

LEE (2003) utilizou a técnica de RAPD, fazendo a combinação com dois “primers” para avaliar a relação genética existente entre cepas MRSA isoladas de animais e sua possível transferência para humanos. BARTZAVALI-LOUKI et al. (2003) utilizaram a combinação da antibiotipagem e RAPD para analisar a relação entre 57 cepas de MRSA isoladas de um hospital em dois anos de pesquisa. De acordo com esses autores, apesar da técnica RAPD apresentar menor poder discriminatório, comparando-se com PFGE, a combinação de dois ou mais “primers” pode determinar clonalidade de cepas. AL-THAWADI et al. (2003), compararam os resultados de três técnicas genotípicas, entre elas PFGE e RAPD e obtiveram resultados semelhantes na análise da relação genética entre as cepas analisadas.

Os resultados obtidos no teste de suscetibilidade das cepas de *Staphylococcus* sp isoladas frente a diferentes antibióticos mostraram que os 92 isolados clínicos apresentaram altos percentuais de cepas com resistência aos antibióticos β -lactâmicos, com 83,7% para a amoxicilina, 56,5% para a ampicilina, 54,4% para a novobiocina e 42,4% para a oxacilina e clindamicina (Tabela 2).

Outras cepas apresentaram resistências variando de 29,4 a 39,1% aos antibióticos cefazolina, azitromicina e ciprofloxacina. Com relação à associação do ácido clavulânico+amoxicilina, 15,2% das cepas apresentaram-se resistentes. Os isolados que apresentaram resistências à vancomicina compreendem 8,6% (oito) das cepas de *Staphylococcus* analisadas, sendo seis cepas de *S. coagulase* negativas e duas cepas de *S. coagulase* positivas.

De acordo com RODRIGUES (1997), é recomendável que cada instituição tenha seu mapa de agentes etiológicos, bem como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Esse conhecimento tem fundamental importância para a orientação

na terapêutica assistencial, tornando menos empírica a utilização de antibióticos de amplo espectro em situações emergenciais, contribuindo para a redução da pressão seletiva exercida sobre os microrganismos.

Tabela 2: Susceptibilidade de *Staphylococcus* sp isolados do Hospital Escola, aos onze antimicrobianos testados, através da técnica de difusão de disco.

Antimicrobianos	Sensíveis		Resistentes	
	Nº.	(%)	Nº.	(%)
Oxacilina	53	57,6	39	42,4
Novobiocina	42	45,7	50	54,4
Cefazolina	56	60,9	36	39,1
Ciprofloxacina	65	70,7	27	29,4
Ác. clavulônico + amoxicilina	78	84,8	14	15,2
Vancomicina	84	91,3	8	8,6
Azitromicina	59	64,1	33	35,9
Clindamicina	53	57,6	39	42,4
Amoxicilina	15	16,3	77	83,7
Enrofloxacina	60	65,2	32	34,8
Ampicilina	40	43,5	52	56,5

Pelos resultados obtidos através do teste de sensibilidade das 92 (100,0%) cepas de *Staphylococcus* sp isoladas observa-se que 78 (84,8%) apresentaram resistência a mais de um antibiótico (Tabela 3). Destacam-se quatro (4,3%) cepas de *Staphylococcus* sp resistentes aos onze antibióticos testados, sendo uma isolada de cabeceira de cama e coagulase positiva e três isoladas de mãos de pacientes, sendo uma coagulase negativa e duas coagulase positiva. Neste caso apesar da porcentagem ser baixa, deve levar em conta que são onze antibióticos testados, incluindo drogas de última geração, podendo assim considerar essas quatro cepas como sendo de “identidade perigosa”, com maior dificuldade de serem eliminadas perante medidas de assepsia, como destaca OLIVEIRA SANTOS & DARINI (2002).

TAVARES (2000) relatou que 30,0% a 100,0% dos *S. aureus* isolados em diferentes regiões do Brasil são resistentes à metilina (oxacilina). TEIXEIRA et al. (1995), encontraram uma média de 56,0 % de cepas resistentes à metilina em estudo abrangendo hospitais de várias regiões do Brasil.

Tabela 3: Padrões e fenótipos de resistência a drogas entre cepas multirresistentes de *Staphylococcus* sp isolados de mãos de humanos e de camas de hospital.

Padrões	n° de cepas		antimicrobianos		
Resistência a 2 drogas	10	5	amo-amp*		
		1	cfz-em		
		1	nv-amo		
		1	nv-cli		
		1	azi-cli		
Resistência a 3 drogas	13	4	nv-amo-amp		
		1	amo-em-amp		
		1	oxa-amo-amp		
		3	azi-amo-amp		
		1	nv-cip-cli		
		1	nv-cli-amo		
		1	nv-cip-amo		
		1	oxa-cip-amo		
Resistência a 4 drogas	13	1	oxa-azi-amo-amp		
		2	azi-cli-amo-amp		
		1	oxa-cip-amo-amp		
		2	nv-azi-amo-amp		
		1	nv-cli-amo-amp		
		1	cfz-cip-azi-amo		
		1	cfz-acm-amo-amp		
		1	oxa-nv-amo-amp		
		1	nv-cfz-azi-amo		
		1	oxa-acm-amo-amp		
		1	cfz-amo-em-amp		
		Resistência a 5 drogas	11	1	oxa-cip-amo-em-amp
				2	oxa-cfz-acm-amo-amp
3	azi-cli-amo-em-amp				
1	nv-van-cli-amo-amp				
1	cfz-cip-azi-amo-em				
1	oxa-nv-cfz-azi-cli				
1	oxa-nv-acm-amo-amp				
1	oxa-nv-cfz-cli-amo				
Resistência a 6 drogas	8	1	nv-cip-azi-amo-em-amp		
		2	oxa-nv-azi-cli-amo-amp		
		2	oxa-nv-cfz-acm-amo-amp		
		1	oxa-cfz-azi-cli-amo-amp		
		1	oxa-cfz-cip-cli-amo-em		
Resistência a 7 drogas	13	1	nv-cfz-cip-cli-amo-em		
		1	oxa-nv-cip-azi-cli-amo-em		
		1	oxa-nv-cfz-cip-amo-em-amp		
		3	oxa-nv-cfz-cip-azi-amo-em		
		1	nv-cfz-cip-azi-cli-amo-em		
		1	oxa-nv-cfz-acm-van-cli-amo		
		1	oxa-nv-cip-azi-cli-amo-amp		
		4	oxa-nv-cfz-cip-cli-amo-em		
Resistência a 8 drogas	5	1	oxa-nv-cfz-acm-amo-em-amp		
		1	oxa-nv-cip-azi-cli-amo-em-amp		
		1	oxa-nv-cfz-azi-cli-amo-em-amp		
		1	nv-cfz-cip-azi-cli-amo-em-amp		
		1	oxa-nv-cfz-van-cli-amo-em-amp		
Resistência a 9 drogas	1	1	oxa-nv-cfz-cip-azi-cli-amo-em		
		1	oxa-nv-cfz-cip-van-azi-cli-amo-em		
Resistência a 11 drogas	4	4	oxa-nv-cfz-cip-acm-van-azi-cli-amo-em-amp		

*-oxa-oxacilina, nv-novobiocina, cfz-cefazolina, cip-ciprofloxacina, acm-ácido clavulônico+amoxicilina, van-vancomicina, azi-azitromicina, cli-clindamicina, amo-amoxicilina, em-enrofloxacina, amp-ampicilina.

No presente estudo o percentual de resistência à metilina dentro das cepas isoladas no setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola de Ribeirão Preto é de 42,4%, um percentual alto, isto demonstra perigo para os hospitais, pois em caso de um surto de infecção hospitalar seria mais difícil para controlar a infecção.

A incidência de cepas resistentes à metilina pode variar entre diferentes hospitais, mas na maioria dos hospitais a prevalência tem aumentado. Entre 1990 e 1997 foi observado um aumento de 260,0% na incidência de cepas resistentes a metilina em diversos hospitais participantes de um estudo de monitoramento (GRAFFUNDER & VENEZIA, 2002). O conhecimento dos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de processos infecciosos é objeto de estudo em diversos centros de pesquisa. Os principais fatores para o desenvolvimento dessas infecções são: hospitalização prévia, internações prolongadas, cirurgia, nutrição parenteral e ou uso de quinolonas (GRAFFUNDER & VENEZIA (2002).

Infecções nosocomiais causadas por *Staphylococcus* sp freqüentemente ameaçam a vida e são de difícil tratamento (RELLO et al., 1997). A sensibilidade do microrganismo infectante é limitada a alguns agentes antimicrobianos e o aparecimento de resistência durante terapia acontece com freqüência relativamente alta (CARMELI et al., 1999).

O perfil de sensibilidade mais amplo, apresentado pela maioria das cepas isoladas dos trabalhadores hospitalares pode indicar que esses indivíduos foram colonizados por cepas extra-hospitalares. De acordo com CHAMBERS (2001), ao contrário de cepas hospitalares que apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos, cepas isoladas da comunidade tendem a apresentar resistência somente aos beta-lactâmicos. Isso deve ocorrer porque a pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos é muito menor na comunidade do que em hospitais.

As infecções causadas por *Staphylococcus* com resistência múltipla a antibióticos são problemas crescentes para muitas instituições de saúde (KAWAMURA et al., 1998; MICHELIM et al., 2005), o que representa um risco potencial à saúde pública, podendo dificultar o tratamento de doenças, agravarem quadros clínicos potencialmente curáveis, pois tais infecções restringem o número de antibióticos disponíveis para o seu tratamento. Neste estudo, encontrou-se um percentual alto de cepas multirresistentes (84,8%), mas superiores aos percentuais de *Staphylococcus* sp (76,7%) encontrado em outros ambientes hospitalares (MICHELIM et al., 2005). O surgimento de cepas de *Staphylococcus* resistentes a

vancomicina, demonstrando padrão homogêneo de resistência pode significar um problema mais ameaçador, entretanto cepas com estes perfis fenotípicos são raras (GUERIN et al., 2000; MARCHESE, et al., 2000).

Observou-se também que, oito (8,6%) cepas de *Staphylococcus* foram resistentes à vancomicina, sete apresentaram resistências múltiplas e destas, quatro cepas se mostraram resistentes a todos antimicrobianos testados. Estes dados estão de acordo com outros relatos mostrando cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes a vancomicina e simultaneamente a vários antimicrobianos (CASEY, et al., 2006; WONG et al., 2000). No Brasil, no Estado do Rio de Janeiro e nas cidades de São Paulo e Porto Alegre foram encontradas cepas de *S. aureus* resistentes a glicopeptídeos com resistência intermediária à vancomicina e também na cidade de São Paulo, cepas de *Staphylococcus* coagulase negativas resistentes à vancomicina (MAMIZUKA & OLIVEIRA, 2000).

A resistência a oxacilina/meticilina ou vancomicina é uma seqüência inevitável da pressão seletiva exercida pelos antibióticos. Embora os detalhes da epidemiologia da resistência a essas drogas nos *Staphylococcus* possam mudar, as forças primordiais que direcionam o fenômeno são semelhantes. Em se tratando do *S. aureus*, a questão não é quando a resistência irá ocorrer, mas quão prevalente ela irá se tornar (RICARDO, 2004). Por esse motivo às medidas de assepsia das mãos e dos leitos hospitalares e a racionalização do uso indiscriminado de antibióticos muito contribuirão para diminuição das infecções nosocomiais e melhoria nas respostas aos tratamentos com antibióticos.

OLIVEIRA et al, (2001) relataram a avaliação da tolerância à vancomicina em cepas de *Staphylococcus* resistentes a oxacilina, isoladas de quatro hospitais de São Paulo, incluindo dois universitários. Em média 49,1% das cepas resistentes a oxacilina apresentaram tolerância a vancomicina, concluindo que a tolerância à vancomicina entre as cepas oxacilina-resistentes foi considerada elevada, aumentando as chances de falhas no tratamento com vancomicina. No presente estudo das 39 cepas resistentes a oxacilina sete (17,9%) delas também apresentou resistência a vancomicina, número inferior ao obtido no trabalho citado acima, mas preocupante, pois num total de oito cepas resistentes a vancomicina, sete (87,5%) delas são resistentes a oxacilina. Entre os isolados resistentes à vancomicina e com resistência múltipla aos demais antibióticos, um foi sensível à mistura dos antibióticos ácido clavulânico+amoxicilina, outro à ciprofloxacina e enrofloxacin e um terceiro à

ampicilina e ao ácido clavulânico+amoxicilina. O único isolado, coagulase positivo, resistente à vancomicina, também apresentou resistência múltipla a quatro dos antibióticos testados e foi suscetível à oxacilina, cefazolina, ciprofloxacina, ácido clavulânico+amoxicilina, azitromicina e enrofloxacina. Desta forma, a combinação dos antibióticos ácido clavulânico+amoxicilina foi sensível a três das oito cepas resistentes a vancomicina e com resistência múltipla aos demais antibióticos. Este fato demonstra a importância de se administrar antibióticos conjugados nos tratamentos de infecções hospitalares.

MARTINS & CUNHA (2007) em estudos envolvendo aspectos de resistência, de epidemiologia e genéticos de *S. aureus* e *S. coagulase-negativa*, mais freqüentemente encontrada no Brasil, envolvidos em processos infecciosos de pacientes imunocomprometidos, concluíram que há um estado de emergência de cepas resistentes a vancomicina e que em um futuro próximo poder-se-á ter sérios problemas no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* sp. Promover estudos é necessário para melhorar a detecção de cepas meticilina-resistentes, uma vez que o número de infecção hospitalar por *S. aureus* adquiridos na comunidade e isolados de *S. coagulase-negativa* resistentes a essa droga é crescente.

6. CONCLUSÕES

- As amostras de *Staphylococcus sp* apresentaram heterogeneidade genética,
- Os isolados não puderam ser agrupados segundo sua origem, mostrando uma dispersão de diferentes genótipos entre diferentes origens,
- Não foi obtido separação entre os isolados obtidos a partir de amostras isoladas de camas e portadores humanos mostrando compartilhamento. Como os mesmos genótipos foram encontrados tanto em amostras das camas como das mãos do pessoal da saúde, ficou demonstrado que as cabeceiras de camas podem atuar como local de disseminação de *Staphylococcus* coagulase-positiva e coagulase-negativa e podem ser fonte de infecção hospitalar.
- Através do teste de suscetibilidade aos onze antimicrobianos testados ficou demonstrado um percentual alto de resistências frente a essas drogas. À presença de cepas resistentes à vancomicina é um estado de alerta, pois esta droga é considerada de eleição para tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa,
- Introduzir medidas de assepsia das mãos de pessoal e dos leitos hospitalares e a racionalização do uso indiscriminado de antibióticos muito contribuirá para diminuição das infecções nosocomiais e melhoria nas respostas aos tratamentos com antibióticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-THAWADI, S. I.; KESSIE, G.; DELACRUZ, D.; AL-AHDAL, M. N. A comparative study on the application of 3 molecular methods in epidemiological typing of bacterial isolates using MRSA as a prototype. **Saudi Med. J.**, Riyadh, v. 24, p. 1317-1324, 2003.

ARCHER, G. L.; CLIMO, M. W. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 38, n. 10, p. 2231-2237, 1994.

ASENSIO, A.; GUERRERO, A.; QUEREDA, C.; LIZÁN, M.; MARTINEZ-FERRER M. Colonization an infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Associated factors and eradication. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 17, p. 20-28, 1996.

ATLAS, R. M. Principles of Microbiology. 2^a. ed. New York: McGraw-Hill, 1997. 1298 p.

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. 8^a ed. Washington, DC: asm Press, 2003. p. 384-404.

BARG, N.; CHAMBERS, H.; KERNODLE, D. Borderline susceptibility to antistaphylococcal exclusively by the hiperproduction of β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 35, n. 10, p. 1975-1979, 1991.

BARRET, F. F.; MCGEHEE, R. F.; FINLAND, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriology and epidemiologic observations. **N. Engl J. Med.**, v. 279, p. 441-448, 1968.

BARTZAVALI-LOUKI, C.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Polymerase chain reaction fingerprint of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece are related to certain antibiotypes. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 53, p. 417-422, 2003.

BERETTA, A. L. R. Z. **Epidemiologia Molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isoladas de pacientes do hospital das clínicas - UNICAMP no período de 1991 a 2001**. Campinas, 2004, 137p. (Tese de Doutorado - Instituto de Biologia-UNICAMP).

BOYCE, J. M. Patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 12, p. 79-82, 1991.

BRAIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas**. Araraquara, 2005, 94 p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Câmpus de Araraquara-UNESP).

BURD, M.; HUMPRHEYS, H.; GLYNN, G.; MITCHELL, E.; MCDONALD, P.; JONHSON, H.; MCDONNELL, B.; DOYLE, D.; ROSSNEY, A. Control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Ireland: North-south study of MRSA in Ireland, 1999. **J. Hosp. Infection**. v. 3, p. 297-303, 2003.

CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY-INFECTIOUS DISEASES AND IMMUNIZATION COMMITTEE (CPS-IDIC). Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian pediatric institutions is still a worthwhile goal. **Paediat. Child. Health**. v. 4(5), p. 337-341, 1999.

CARMELI, Y.; TROILLET, N.; ETIOPOULOS, G. M. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risk associated with different anti-pseudomonal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1379-1382, 1999.

CASEY, A. L.; WORTHINGTON, T.; CADDICK, J. M.; HILTON, A. C.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. RAPD for the typing of coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infection. **J. Infect.**, v. 52, p. 282-289, 2006.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. MMWR Morb. Mortal. Weekly Rep., v. 51, p. 565-567, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infections in a State Prison-Mississippi, 2000. MMWR Morb. Mortal. Weekly Rep., v. 50(42), p. 919-922, 2001.

CENTER FOR DISEASES CONTROL (CDC). National Nosocomial Infections Surveillance report, data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. **Am. J. Infect. Control.**, v. 24, p. 380-388, 1996.

CETINKAYA, Y.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; UZUN, Ö.; AKOVA, M.; GÜRSU, G.; UNAL, S. Analysis of a mini-outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a surgical ward by using arbitrarily primed-polymerase chain reaction. **J. Chemother.**, Firenze, v. 12, p. 138-144, 2000.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, p. 178-182, 2001.

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

COHEN, M. L. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanism of virulence, epidemiology. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 108 (5), p.796-799, 1986.

CONTERNO, L. O. Fatores de risco para letalidade da bacteremia por *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 1994, (Dissertação de mestrado). Escola Paulista de Medicina - UNIFESP. p. 96.

CSUKAS, Z.; TORO, K.; JANKOVICS, I.; ROZGONYI, F.; SOTONYI, P. Detection and toxin production of *Staphylococcus aureus* in sudden infant death cases in Hungary. **Acta Microbiol. Immunol.**, Hung. Budapest, v. 48 (2), p.129-141, 2001.

DALLA COSTA, L. M.; SOUZA, D. C.; MARTINS, L. T.; ZANELLA, R. C.; BRANDILONE, M. C.; BOKERMANN, S. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First case in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 2(3), p. 160-163, 1998.

DAUTLE, M. P.; ULRICH, R. L.; HUGLES, T. A. Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, p. 414-421, 2002.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**. v. 264, p. 375-82, 1994.

DEL'ALAMO, L.; HUBAND, M. D. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 185-191, 1999.

DIAS, C. A. G.; KADER, I. A.; AZEVEDO, P.; BECKER, A.; JURACH, A.; PESCADOR, M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the stethoscopes. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 28, p. 82-84, 1997.

DOUZANI, L. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **Fems Microbiol. Lett.**, v. 119, p. 167-174, 1994.

EFUNTOYE, M. O.; ADETOSOYE, A. I. Enterotoxigenicity and drug sensitivity of staphylococci from children aged five years and below with sporadic diarrhea. **East Afr. Med.**, Ago-Iwoye, Nigeria, v. 80, n. 12, p. 656-659. 2003.

ELLIOT, M. J.; KELLUN, M. T.; TENOVER, F. C.; PETTRIESS, R. L. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among paramedics in the Sedgwick Medical Service in Wichita, Kansas. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 23(2), p. 60-63, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FILE JR., T. M. Overview of resistance in the 1990. **Chest.**, v. 15, n. 3, p. 3S-8S, 1999. Supplement.

FRIDKIN, S. K. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 108-115, 2001.

FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P. Antimicrobial Resistance in Intensive Care Units. **Clinics in Chest Medicine.** v. 20, n. 2, 1999.

FUNG, C. P.; HO, M. W.; WANG, F. D.; TSAI, K.; LIU, C. E.; LIU, C. Y.; SIU, L. K. Investigation of an outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cardiovascular surgery unit by ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. **APMIS**, Copenhagen, v. 109, p. 474-480, 2001.

GOLDMANN, D. A.; WEINSTEIN, R. A.; WENZEL, R. P. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. **JAMA**, v. 275, p. 234-240, 1996.

GOOSENS, H.; FERRECH, M.; STICHELE, R. V. Proyecto de Grupo ESAC. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance; a cross-national database study. **Lancet.**, v. 365, p. 579-587, 2005.

GRAFFUNDER, E. M. & VENEZIA, R. A. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA infection including previous use of antimicrobials. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 49, p. 999-1005, 2002.

GUERIN, F.; BUU-HOI, A.; MAINARDI, J. L.; KAC, G.; COLARDELLE, N.; SABINE VAUPRÉ, S.; GUTMANN, L.; PODGLAJEN, L. Outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38 (8), p. 2985-2988, 2000.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **Int. J. Syst. Evol. Microb.**, v. 51, p. 731-735, 2001.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E. Microbiology procedures for the diagnoses of bovine udder infection. Arlington: National Mastitis Council, 1990, 34p.

HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low affinity penicillin binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v.158, n.2, p. 513-516, 1984.

HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E. M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 22, p. 443-448, 2001.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in *Staphylococci*. **Drug. Resistance Updates.** v. 1, p.135-50, 1998.

HIRAMATSU, K.; HANAOKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 40, p. 135-136, 1997b.

HIRAMATSU, K. ; HANAOKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Dissemination in Japanese hospital of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet.**, v. 350, p. 1670-1673, 1997a.

JACOBY, G. A.; ARCHER, G. A. A new mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **N. Engl. J. Med.**, v. 324(9), p. 601-612, 1991.

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

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

KAWAMURA, Y.; HOU, X. G.; SULTANA, F.; HIROSE, F.; MIYAKE, M.; SHU, S. E.; EZAKI, T. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2038-2042, 1998.

KLOOS, W. E. *Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans: the staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, 1997, 113-138.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS JR., G. **Textbook of diagnostic microbiology**. New York: Saunders. 1995. p. 264-277.

KLYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, underlying mechanisms and associated risks. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, p. 505-520, 1997.

KONDOH, K.; FURUYA, D.; YAGIHASHI, A.; UEHARA, N.; NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, D.; TSUJI, N.; WATANABE, N. comparison of arbitrarily primed-polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, oxford, v. 35, p. 62-67, 2002.

KOTILAINEN, P.; ROUTAMAA, M.; PELTONEN, R.; OKSI, J.; RINTALA, E.; MEURMAN, O.; LEHTONEN, O.; EEROLA, E.; SALMENLINNA,; VUOPIO-VARKILA, L.; ROSSI, T. elimination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a university hospital and district institutions, Finland. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 9, p. 169-175, 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª ed, Medsi, Rio de Janeiro, 2001, p.263-319.

LALEY, R. T.; LANZ, E.; SCHROCK, C. G.; Rapid control of an outbreak of *Staphylococcus aureus* on a neonatal intensive care department using standard infection control practices and nasal mupirocin. **Am. J. Infec. Control.**, v. 32, p. 44-47, 2004.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission and clonal spread of several strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 6494, 2003.

LEVY, S. B. Active efflux mechanisms of antibiotic resistance. **Antimicrob. Chemother.** v. 36, p. 695-703, 1992.

LEVY, C. E; MONTELLI, A. C.; FURTADO, J.S. Resistência a drogas em cepas bacterianas de pacientes de serviços hospitalares: laboratório de referência do sistema COBA. **Rev. Microbiol.**, v. 22, p. 21-27, 1991.

LOWY, D. F. antimicrobial resistance; the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 111, p. 1265-1273, 2003.

LOWY, D. F. antimicrobial resistance; the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 111, p. 1265-1273, 2003.

LOWY, D. F. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 520-532, 1998.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8^a ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986 p.

MALOUIN, F.; BRYAN, L. E. Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30 (1), p. 1-5, 1986.

MAMIZUKA, E. M.; OLIVEIRA, G. A. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospital brasileiro. **Pharm. Bras.**, v. 6, p. 6-7, 2000.

MARCHESE, A.; BALISTRERI, G.; TORROLI, E.; SCHITO, G. C. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.866-869, 2000.

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 aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 618-623,1998.

MARTINS, A.; CUNHA, M. L. R. S. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*: Epidemiological and molecular aspects. **Microbiol. Immunol.**, v. 51 (9), p. 787-795, 2007.

MARTINS, T.; SILVINO, Z. O cateter central de inserção periférica: uma alternativa para a redução do índice de infecção hospitalar em uma unidade pediátrica. **Braz. J. Nursing**, vol 5 (3), 2006.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBIT, R. D. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Inf. Dis.**, v. 17, p. 153-164. 1993.

MASSIDA, O.; MONTANARI, M. P.; VARALDO, E. Evidence for a methicillin hydrolysing β -lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. **Fems Microbiol. Lett.**, v. 92, p. 223-228, 1992.

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

MELO, G. B.; MELO, M. C.; GAMA, A. P.; CARVALHO, K. S.; JESUS, T. C.; BONETTI, A. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Analysis of The Genetic Diversity Of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 126-130, 2005.

MICHELI, M. R.; BOVA, R., PASCALE, E.; AMBROSIO, E. D. Reproducible DNA fingerprint with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 1921-1922, 1994.

MICHELIM, L.; MICHELE LAHUDE, M.; ARAÚJO, P.R.; GIOVANAZ, D.S.H.; MÜLLER, G.; DELAMARE, A.P.L.; COSTA, S. O. P; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 2.616 de 26 de maio de 1998. Dispõe a respeito do controle de infecção hospitalar. Diário Oficial da União, Brasília, 13 de maio, 1998.

MLYNARCZYK, G.; KOCHMAN, M.; LAWRYNOWICZ, M.; FORDYMACKI, P.; MLYNARCZYK, A.; JELJASZEWICZ, J. Coagulase negative variants of methicillin

resistant *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* strains isolated from hospital specimens. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 288, p. 373-381, 1998.

MOREIRA, M.; MEDEIROS, E. A. S.; PIGNATARI, A. C. C.; WEY, S. B.; CARDO, D. M. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 44(4), p. 263-268, 1998.

MOURA, K. K. V.; SILVA, A. A. Infecção hospitalar: a solução em nossas mãos. **Ciência hoje**, p. 29, 2001.

MULLIGAN, M. E.; MURRAY-LEISURE, K. A.; RIBNER, B. S.; STANDIFORD, H. C.; JOHN, J. F.; KORVICK, J. A.; KAUFFMAN, C. A.; YU, V. L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. **Am. J. Med.**, San Francisco, v. 94, p. 313-328, 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Approved Standard M2-A7. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test, v. 15(14), Approved Standard, Villanova, Pa, 2002.

NEI, M. Definition estimation of fixation indices. **Evolution**, v. 40, p. 643-645, 1986.

NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**. v. 257, p. 1064-1073, 1992.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**. v. 264, p.382–388, 1994.

NOBLE, W. C.; VIRANI, Z.; CREE, R. G. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **Fems Microbiol Lett**. v. 93, p.195-198, 1992.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

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

OLIVEIRA, G. A.; LEVY, C. E.; MAMIZUKA, E. M. Estudo do perfil de resistência de 626 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de 25 hospitais brasileiros entre setembro de 1995 e junho de 1997. **J. Bras. Pat.**, v.36, p.147-156, 2000.

OLIVEIRA SANTOS, B. M. & DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores sãos relacionados de uma creche de hospital universitário. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 160-172, 2002.

OLIVEIRA SANTOS, B. M. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. **Rev. latino-am. enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 8(1), p. 67-73, 2000.

OLIVEIRA SANTOS, B. M. Estudo longitudinal sobre portador são de *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34(4), p. 395-400, 1999.

OLMOS, A.; CAMARENA, J. J.; NOGUEIRA, J. M.; NAVARRO, J. C.; RISEN, J.; SÁNCHEZ, R. Application of a optimized and highly discriminatory method base don arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 1128-1134, 1998.

O'TOOLE, R. D.; DREW, W. L.; DAHLGREN, B. J.; BEAT, H. N. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection- observations in hospital and nursing home. **JAMA**. v. 213, p. 257-263, 1970.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2000. Disponível em www.opas.org.br, acesso em setembro de 2007.

PAGE, R. D. M. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PALAZZO, I. C. V. Detecção de estafilococos resistentes à meticilina e vancomicina em portadores humanos em ambiente intra e extra hospitalar. Jaboticabal (SP), 2000, 78p. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP).

PARKER, M. T.; HEWITT, J. G. Methicillin-resistant in *Staphylococcus aureus*. **Lancet.**, v.1, p.800-804, 1970.

PELCZAR JR.; J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e aplicações, v. II. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 517p

PERL, T. M.; CULLEN, J. J.; WENZEL, R. P.; ZIMMERMAN, M. B.; PFALLER, M.A.; SHEPPARD, D.; TWOMBLEY, J.; FRENCH, P.P.; HERWALDT, L. A. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Méd.**, v. 346(24), p. 1871-1877, 2002.

POWER, E. G. M. RAPD typing in microbiology – a technical review. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 34, p. 247-265, 1996.

QUINN, P. J. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. **Proc. R. Soc. Exp. Biol.**, v. 51, p. 386-389, 1942.

RELLO, J.; RUE, M.; JUBERT, P. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. **Crit. Care Med.**, v. 25, p. 1862-1867, 1997.

REZENDE, E. M.; STARLING, C. E. F.; COUTO, B. R. G. M.; RIEGG, E.; PRADO, I. Prevalência de *Staphylococcus aureus* multiresistente em hospitais gerais de Belo Horizonte. In: Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar, Recife, 1994. p. 83.

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

RODRIGUES, E. A. C. Infecções do trato urinário. In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M. B. (Eds). **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997, p. 135-148.

ROMERO-VIVAS J.; RUBIO, M.; FERNANDEZ, C.; PICAZO, J. J. Mortality associated with nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 1417-1423, 1995.

SADER, S. S.; PIGNATARI, A. C.; RICHARD, J. H.; RONALD, N. J. Evaluation of interhospital spread of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 15, p. 320-323, 1994.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. CSH Laboratory Press, 1989.

SANTOS, H. L. R. Perfil de sensibilidade do *S. aureus* e *S. epidermidis* no Hospital Municipal Souza Aguiar, 1º semestre de 1998. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32 (supl 1), 423 p, 1999.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 51(5), p. 873-884, 1986.

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; JOHN, J. F. JR. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, 584-599, 1997.

SMITH, T. L.; PEARSON, M. L.; WILCOX, K. R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 493–501, 1999.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. W. H. Freeman and company, San Francisco, 1973.

SOUZA, M. C.; ITO, I. Y. *Staphylococcus aureus*: sensibilidade de 390 cepas isoladas de unidade hospitalar de queimados a 12 antimicrobianos. **J. Bras. Med.**, v. 64, p. 112-118, 1993.

SPERBER, W. H. & TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiol.**, v. 29, p. 502-505, 1975.

SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**. v. 264, p. 388-393, 1994.

STAMM, A. M.; LONG, M. N. Belcher, B. Higher overall nosocomial infection rate because of increased attack rate of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. **Am. J. Infect. Control.**, v. 21, p. 70-74, 1993.

STATISTICAL REPORT INFECTION CONTROL THROUGH SURVEILLANCE (HELICS- SSI), 2006. Disponível em <http://helics.univ-lyon1.fr/about.htm> . Acesso: 20 de Abril de 2006.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene integration functions: integrons. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 1669-1683, 1989.

STRANDÉN, A.; FREI, R.; WIDMER, A. F. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, p. 3181-3186, 2003.

TAMBIC, A.; POWER, E. G.; 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.**, Washington, v. 35, p. 3092-3097, 1997.

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

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2^a. ed. São Paulo: Atheneu, 1996, 792 p.

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

TENOVER, F. C. VRSA, VISA, and GISA: the dilemma behind the name game. **Clin. Microbiol. Newsl.**, v. 22, p. 49-52, 2000.

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.**, New Jersey, v. 18, p. 426-439, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Artmed Editora. Porto Alegre, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6^a ed. Artmed Editora. Porto Alegre, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B.; CAMPOS, L.; CARVALHO; GOMPertz, O. F.; RÁCZ, M. L. **Microbiologia**, 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

VAN BELKUM, A.; SLUIJTER, M.; DE GROOT, R.; VERBRUGH, H. A.; HERMANS, P. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 1176-1179, 1996.

VANDENBERGH, M. F. Q.; YZERMAN, E. P. F.; VANDELKUM, A.; BOELEN, H. A. M.; SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. A. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 3133-3140, 1999.

WALDVOGEL, F. A. *Staphylococcus aureus* (including Toxic Shock Syndrome). In: MANDELL, G.L.; BENNET, J.E.; DOLIN, R. Principles and practices of infectious diseases. 5^a ed. New York: **Churchil Livingstone**, p. 2069-2092, 2000.

WAGENVOORT, J. H.; SLUIJSMANS, W.; PENDERS, R. J. Better environmental survival of outbreak is sporadic MRSA isolates. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 45, p. 231-234, 2000.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18(22), p. 6531-6535, 1990.

WONG, S. S.; NG, T. K.; YAM, W. C. ; TSANG, D. N. ; WOO, P. C. ; FUNG, S. K. ; YUEN, K. Y. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility vancomycin. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 261-268, 2000.

WOODFORD N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. **Microb. Drug. Resist.**, v. 7, p. 229-236, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)