UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

LUCIMARA CRISTINA BUENO PRADO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMBIENTES CLÍNICOS

Mogi das Cruzes - SP

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

LUCIMARA CRISTINA BUENO PRADO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMBIENTES CLINICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte do requisito para obtenção do título de Mestre.

Profº Orientador: Dr Welington Luiz de Araújo

Mogi das Cruzes - SP

2007

UMC
universidade de mogi das cruzes

Tel.: (011) 4798-7000
Fax: (011) 4799-5233
http://www.umc.br

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às treze horas do dia vinte e seis de outubro de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE AMBIENTES CLÍNICOS" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Lucimara Cristina Bueno Prado**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Welington Luiz de Araújo e Ivarne Luis dos Santos Tersariol da Universidade de Mogi das Cruzes e Paulo Teixeira Lacava da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as argüições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE.
(aprovado(a) /reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 26 de outubro de 2007.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo	APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol	Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Paulo Teixeira Laçava	APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Prado, Lucimara Cristina Bueno

Diversidade genética de *Staphylococcus aureus* isolados de ambientes clínicos / Lucimara Cristina Bueno Prado. -- 2008.

76 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2007
Área de concentração: Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz Araujo

1. *Staphylococcus aureus* 2. Antibióticos 3. Resistência 4. Diversidade 5. *Escherichia coli* 6. Infecção hospitalar I. Título II. Araujo, Welington Luiz

CDD 579.353

“ Ninguém ignora tudo. Niguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos algumas coisas.
Por isso apreendemos sempre”

Paulo Freire

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que deu saúde. Luz e amor para realização de obras que possa fazer diferença.

Dedico também à minha família, especialmente a minha filha Ana Francisca, que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho de forma tão intensa.

AGRADECIMENTOS

Especialmente:

Ao Professor Dr. Wellington Luiz de Araújo, orientador e amigo pela paciência, sabedoria e incentivo.

Ao Hospital Dr. Osíris Florindo Coelho, por oferecer a oportunidade de realização deste trabalho.

Aos meus familiares pela compreensão e incentivo nesta caminhada, principalmente à minha irmã Denise, a qual sempre esteve presente com sua dedicação, paciência e apoio.

Aos integrantes do Departamento de Genética, Laboratório de Genética de Microorganismo “ Professor João Lucio de Azevedo”, Departamento de Genética da ESALQ/USP.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most infection caused in hospitals . This bacterium produces several toxins as such as super antigens that became an important opportunist patogeno nosocomial in patients who are at some time hospitalized in UTI (Unit of Intensive Therapy) using prolonged antibióticoterapia treatment. Debilitating illnesses such as: diabetes and cancer, ventilation mechanics, intensive use of intravenosos catheters and imunossupressão. The intense use of antibiotics and clinical infections can be one of the factors for selection of the resistance between bacterial populations in hospital environments. These microrganismos are also used as the main source of the sanitary ambient quality. The samples analyzed in this project was collected at Dr. Osíris Florindo Coelho de Ferraz de Vasconcelos/São Paulo Hospital, where a survey of the clinical environment species was carried throughout the period of January 2002 to December 2004. The patógenos of the biological isolated clinic samples were analyzed and also the resistance to various antibiotics identified by classic techniques of microbiology. However, the molecular technique of ARDRA for genetic characterization was used and that allowed the analysis of correlation between the isolateds.

Keywords: Infection hospitals, *Staphylococcus aureus* ,Resistance antibiotics, patogeno nosocomial.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um dos maiores causadores de infecção hospitalar. Esta bactéria produz numerosas toxinas incluindo super antígenos, pois, é um importante patógeno oportunista nosocomial principalmente em pacientes que estão hospitalizados há muito tempo em UTI (Unidade de Terapia Intensiva), fazendo uso prolongado de: antibióticoterapia, ventilação mecânica, cateteres intra venoso e imunosupressão. O uso intenso de antibióticos e infecções clínicas pode ser um dos fatores para seleção da resistência entre as populações bacterianas em ambientes hospitalares. Esses microrganismos são também utilizados como principal indicador de qualidade sanitária ambiental. As amostras analisadas nesse projeto foram coletadas do Hospital Dr. Osíris Florindo Coelho de Ferraz de Vasconcelos/São Paulo, onde foi realizado um levantamento das espécies obtidas de ambiente clínico-hospitalares, no período de janeiro de 2002 à dezembro de 2004. Os patógenos de amostras biológicas de isolados clínicos foram analisados também quanto a resistências à diversos antibióticos e identificados por meio de técnicas clássicas de microbiologia. Contudo, foi utilizada a técnica molecular de ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) para caracterização genética que permitiu a análise de correlação entre os isolados.

Palavra-chave: Infecção Hospitalar, *Staphylococcus aureus*, Resistência a Antibióticos, patógeno nosocomial.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Am.....	Ampicilina
Ak.....	Amicacina
CDC.....	Center for Disease Control and Prevention
Cf.....	Cefalotina
Cfz.....	Cefazolina
Crm.....	Cefuroxina
Cff.....	Cefotetan
Cpd.....	Cefpodoxina
Caz.....	Cefatazidima
Cax.....	Ceftriaxona
Cpe.....	Cefepime
.Cp.....	Ciprofloxacina
DNAse.....	Desaxiribonucleares
HEPA.....	High Efficiency particulate air
Imp.....	Imipinem
MRSA.....	*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
.MIC.....	Concentração mínima inibitória
NCCLS.....	National Commitee for clinical Laboratory Santandars
NaCl .	Cloreto de Sódio
P/T.....	Piperacicilina/Tazobactam
RN.....	Recém nascido
SSSS.....	Toxina esfoliativa da síndrome da pele escaldada estafilocócica
TSST1.....	Toxina da síndrome do choque tóxico estfilocócico
To.....	Tobramicina
T/S.....	Trimetoprim/Sulfametoxazol
UTI.....	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. Crescimento bacteriano e produção de interoxina de acordo com a temperatura e pH.....17

Figura 1. Fluxograma de coleta de amostras clínicas de ambientes do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos.....37

Tabela 2. Classificação dos antibióticos utilizados.....43

Tabela 3. Ponte de corte para interpretação do antibiograma (M/C-μ/ml) em: sensível, intermediário e resistente.....44

Tabela 4. Diversidade dos isolados em diferentes ambientes nos períodos: 2002,2003e 2004 do Laboratório do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos.....49

Figura 2. Frequência na freqüência relativa de amostras de *Staphylococcus aureus*.....50

Figura 3. Variação na freqüência relativa de *Staphylococcus spp*.....51

Figura 4. Variação na freqüência relativa de *Staphylococcus spp*.....53

Figura 5. Distribuição de *Staphylococcus aureus* nos diferentes ambientes.....55

Figura 6. Distribuição dos diferentes haplótipos de *Staphylococcus aureus*.....57

Figura 7. Distribuição dos haplótipos de *Staphylococus aureus* em diferentes períodos 58

Figura 8. Variação na freqüência relativa das amostras avaliadas nos diversos ambientes clínicos-hospitalares..... 59

Figura 9. Gel de agarose Ardra..... 57

Tabela 5. População relativa dos antibióticos resistentes em amostras clínico-Hospitalares 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... .13

1.1. *Staphylococcus aureus* 13

1.1.2. Fatores de virulência.....14

1.1.3. Diagnóstico 17

1.1.4. Tratamento 18

1.1.5. Epidemiologia 18

1.1.6. Patogenicidade..... 20

1.1.7. Resistência aos antimicrobianos.....21

1.1.8. Agentes contaminantes.....24

1.1.9. Infecções Hospitalares.....27

1.1.10 Padrões de Partículas.....29

1.1.11. Saúde Pública.....32

2 OBJETIVOS ..... .35

2.1. Objetivos gerais.....35

2.2. Objetivos específicos.....35

3 MÉTODOS.....36

3.1 Isolamento de bactérias de ambientes clínicos.....36

3.1.1. Coleta de amostras 36

3.1.1.1 Descrição do procedimento para realização das coletas

Das amostras clínico-hospitalares..... 37

3.1.2. Identificação dos isolados bacterianos.....37

3.1.3. Provas bioquímicas do sistema Microscan® 39

- Carboidratos.....39
- Uréia 40

- Sulfeto de hidrogênio 40
- Indol.....40
- Triptofano disaminase.....40
- Hidrolise da Esculina 40
- Voges – Pros Kauer 41
- Glactosidade..... 41
- Colistina..... 41
- Citocromo oxidase..... 41

3.1.4. Análise de antibiograma.....42

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....45

3.2.1. Extração DNA genômico total 45

3.2.2.. Amplificação do 16SrDNA das bactérias..... 46

3.2.3. Clivagem do gene 16 SrDNA com enzimas de restrição...46

3.2.4. Análise da variabilidade genética por ARDRA.....47

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....48

4.1. Isolamento de bactérias em ambiente hospitalar.....48

4.2. Caracterização de *Staphylococcus aureus*.....54

4.2.1. Isolamento.....54

4.2.2. Antibiograma.....55

4.2.3. Caracterização genética do *Staphylococcus aureus*.....,.56

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES 61

REFERÊNCIAS 62

1 Introdução

1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende várias espécies, sendo *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* de interesse médico. *S. aureus* foi descrito pela primeira vez em 1878, por ROBERT KOCK a partir de pústulas humanas. Em 1880, o cirurgião escocês, Alexander Ogston, em suas publicações, relatou que *coccus* em formato de cacho de uva, eram a causa de um grande número de doenças piogênicas no homem. Subseqüentemente, em 1882, ele chamou este organismo de *Staphylococcus*, nome derivado da palavra grega *staphylé*, que tem o significado de cacho de uva (BAIRD-PARKER et al., 1990). Segundo a nona edição do Manual Bergey's, atualmente, 28 espécies e outras sub-espécies foram descritas com base nos estudos de homologia de DNA e características bioquímicas e imunoquímicas (HOLT et al., 1994). Destas, somente 16 espécies são encontradas em humanos (MURRAY et al.,1996). *S. aureus* tem 0,5 a 1,5mm de diâmetro, pode aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos, é Gram positivo, imóvel, não produz esporos, catalase positivo e anaeróbico facultativo (HOLT et al.,1994). Geralmente são oxidase negativa, não produzem cápsulas sendo que algumas cepas podem apresenta-las. Há um bom crescimento de *Staphylococcus* spp. em meios de cultura comuns em microbiologia. As bactérias pertencentes a este gênero são tolerantes a concentração de 10% de NaCl e também a nitritos, permitindo assim seu

crescimento, mesmo em alimentos curados (MURRAY et al.,1996). As espécies do gênero *Staphylococcus* são mesófilas, apresentam temperatura para crescimento entre 6,7 à 48ºC sendo considerado ótimo em 37º e pH 4,0 a 9,6 sendo ótimo pH 7,0 (BAIRD PARKER et al., 1990; GENIGEORGIS et al., 1989).

Segundo a nona edição do Manual Bergeys (HOLT et al.,1994), somente as espécies *S. aureus, S. delphini, S. intermedius,* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase positiva. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativa. Estas não são reconhecidas como importante causa de doenças (GENIGEORGIS et al.,1989), mas sabe-se que algumas também podem produzir enterotoxinas (GENIGEORGIS et al.,1989; BAIRD-PARKER et al.,1990) e podem ser isoladas nos alimentos uma vez que tanto o homem quanto os animais são portadores usuais destas cepas (PEREIRA et al., 2001).

1.1.2 Fatores de virulência

Os fatores de virulência são todos os mecanismos que permitem a invasão do hospedeiro, ou a evasão da bactéria ao sistema imune. Segundo Trabulsi et al. (1999) e Baird-Parker et al. (1999) os fatores de virulência de *Staphylococcus* são:

- A cápsula confere proteção a muitas cepas contra a fagocitose e o sistema imune. Alguns isolados de *S. aureus* são capsulados e, portanto, mais resistentes à fagocitose do que os não capsulados.
- Peptidoglicanos na parede celular pode ter atividade de endotoxina, causando estímulos como febre e vasodilatação.

- Proteína A: neutraliza imunoglobulinas (anticorpos), e são encontradas em mais de 90% das amostras de *S. aureus*. A proteína A se encontra na parede bacteriana, ligada covalentemente ao peptideoglicano. A proteína A é liberada para o meio de cultura quando a bactéria é crescida *in vitro*, o que provavelmente pode ocorrer também nos processos inflamatórios. A proteína A é composta de uma única cadeia polipeptídica com um peso molecular de 42 daltons.
- Ácidos teicóicos: são fibrilas como o polissacarídeo A que serve para ancorar a bactéria, impedindo-a de ser arrastada (pelo sangue, urina, suor ou outros fluidos) da sua área de colonização.
- Toxina alfa: destrói vários tipos de células do hospedeiro.
- Toxina delta: desestabiliza a membrana celular e mata, por lise, eritrócitos e muitos outros tipos de células.
- Toxina gama e leucocidina P-V: grupo de até seis toxinas que formam poros na membrana celular de leucócitos, destruindo-os por lise.
- Coagulase: coagula o sangue ao transformar o fibrinogênio em fibrina, da mesma forma que a trombina humana. A formação de coágulos à volta das bactérias dificulta o seu reconhecimento e fagocitose pelas células do sistema imunológico.
- Fibrolisina ou estafilocinase: produzido por *S. aureus*, dissolve os coágulos de fibrina.
- Hialuronidase: o ácido hialurônico degrada a matriz extracelular humana, e dessa forma facilita a invasão dos tecidos.

- Catalase: protege as bactérias dos ataques com superóxidos produzidos como defesa pelos leucócitos, transformando o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.

- Penicilinase: produzida pelas cepas resistentes ao antibiótico penicilina, o qual é degradado por esta enzima. Por meio de conjugação, isolados sensíveis podem adquirir o gene de resistência.
- Adesina: As adesinoglucoproteínas permitem que a bactéria se ligue ao hospedeiro.
- Enzimas extracelulares: A desoxiribonucleases (DNAse), e a estafiloquinase estimula a transformação do plasmionogênio em plasmina, enzima proteolítica que degrada a fibrina dos coágulos.
- Hemolisina: Foram caracterizadas 4 hemolisinas (α, β, λ e δ) em *S. aureus* sendo a toxina α a mais encontrada em amostras de origem humana. Esta hemolisina é tóxica para plaquetas humanas e letais para animais, quando inoculada por via sistêmica.
- Leucocidina: A leucocidina é uma toxina que possui a capacidade de desgranular neutrófilos e macrófagos humanos e de coelhos, as quais aparentemente são as únicas células sensíveis. Para alguns, a leucocidina interfere com permeabilidade dos leucócitos aos cátions, promovendo saída de K^{+} e entrada de Ca^{++}. A desgranulação seria, assim, secundária a estes efeitos primários.

1.1.3 Diagnóstico

Para identificação desse microrganismo é feito o isolamento em meios de cultura como agar-sangue. A diferenciação do *S. aureus*, das outras espécies do gênero, é feita pela pesquisa de coagulase e pelo teste de sensibilidade a novo biocina (TRABULSI et al., 1999; KONEMAN et al., 2001). A tabela 1 apresenta os fatores que afetam o crescimento e a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus*:

Tabela 1: Crescimento bacteriano e produção de enterotoxina de acordo com a temperatura e pH.

Crescimento da bactéria			Produção de enterotoxinas	
Fator	**Ótimo**	**Faixa**	**Ótimo**	**Faixa**
Temperatura (ºC)	**37**	**7-48**	**40-45**	**10-48**
PH	**6-7**	**4-10**	**7-8**	**4-9,6**

Fonte: Adaptado de Baird -Packer et al. (1990).

Nos casos de intoxicação alimentar, o diagnóstico realizado é feito por pesquisa das enterotoxinas em vômito de paciente e alimentos. *S. aureus* é encontrado em grande quantidade (10^5 UFC.g^{-1}) no alimento que contém a enterotoxina responsável pelas manifestações clínicas. No exame bacterioscópico das secreções purulentas, geralmente vê-se a bactéria formando pequenos cachos isolados (SALOMÃO et al., 1993; BUTTNER et al.,1997).

1.1.4 Tratamento

S. aureus é naturalmente sensível às penicilinas, cefalosporina, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e as outras drogas ativas contra bactérias gram-positivas. Na maioria das amostras a resistência é mediada por plasmídios que codificam a síntese de enzimas inativantes do antibiótico (β-lactamases, acetil-transferases, etc). A resistência é mediada por plasmídios, algumas amostras podem apresentar resistência a meticilina, aparentemente cromossômica, e tolerância à penicilina. As amostras resistentes à meticilina, geralmente apresentam resistência a outros antibióticos. Essas amostras proliferam mais lentamente, formando colônias menores que as amostras portadoras de plasmídios. Na tolerância à penicilina, a amostra tem seu crescimento inibido por baixas concentrações da droga, mas somente é destruída por concentrações elevadas (HIRAMATSU et al., 1999; LACEY et al., 1994).

1.1.5 Epidemiologia

S. aureus é conhecido como causador de infecções intra-hospitalares, sendo associado a 7,5% das sepses tardias, 16,7% das pneumonias e 22% das infecções de sítio cirúrgico (GAYNES et al., 1996). Em infecção, há a presença de diferentes clones de *S. aureus* nas UTI, ocorrendo aumento de um único clone

durante as epidemias, especialmente (SARO) (NAMBIAR et al., 2003). Na população adulta existem de 30 a 70% de portadores de *S. aureus*, principalmente na nasofaringe: em caráter transitório são 30 a 50% e persistentemente são de 10 a 20% (GRAHAM et al., 2002; CIMOLAI et al., 2003; GILLESPIE et al., 1958).

No período neonatal, já na primeira semana de vida, existe colonização por *S. aureus* em 20 a 90% dos RN (recém nascido), sendo os locais mais freqüentes o coto umbilical e as narinas: posteriormente a orofaringe torna-se o local preferencial (CIMOLAI et al., 2003; GILLESPIE et al., 1958; MUTO et al., 2003; MERRER et al., 2000). O risco de um paciente colonizado ter infecção está também relacionado com o tipo de cápsula do microrganismo, uma vez que há diferença no antígeno capsular tipo cinco, o qual é menos invasivo que o tipo oito (SATYASEELA et al., 2004). Segundo (CIMOLAI et al., 2003), os principais riscos de epidemias por *S. aureus* estão relacionado à superpopulação de pacientes, baixa relação profissional da saúde/número de paciente, educação inadequada dos profissionais de saúde, falta de compromisso com a lavagem de mãos, falta de higiene de coto umbilical, isolamento não adequado, profissionais de saúde, e higiene inadequada do ambiente e equipamentos. Estes riscos aumentam principalmente devido ao aumento da fonte de inóculo do patógeno (MERRER et al., 2000).

1.1.6 Patogenicidade

Staphylococcus colonizam a pele e as mucosas dos seres humanos, além de estarem associadas a variados tipos de infecção. As infecções freqüentemente decorrem de trauma ou abrasão, com ruptura das barreiras mecânicas cutâneo-mucosas ao microrganismo agressor, resultando em invasão de sítios profundos (TRABULSI et al., 1999).

Infecções superficiais localizadas, piogênicas, incluem impetigo, foliculites, furúnculos e carbúnculos. O impetigo é uma infecção que acomete principalmente crianças, manifesta-se, inicialmente, por meio de pequenas máculas na pele seguidas de vesículas contendo pústulas que, ao se romperem, originam lesões recobertas por crostas. As foliculites são infecções dos folículos pilosos, que podem se aprofundar e originar os furúnculos, estruturas nodulares dolorosas, com um centro necrótico amolecido. Os carbúnculos, infecções mais graves, resultam da confluência dos furúnculos e extensão para tecidos subcutâneos profundos. Independente da localização inicial da infecção, a natureza invasiva desse microrganismo colabora para a disseminação do processo, causando bacteremia e envolvimento de um ou mais órgãos à distância (endocardite, pneumonia, empiema, osteomielite e artriteséptica) (TRABULSI et al., 1999; BUTTNER et al.,1997).

S. aureus apresenta cinco toxinas citolíticas (alfa, beta, delta, gama e leucocidina), toxina esfoliativa responsável pela síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS), toxina da síndrome do choque tóxico estafilocócico (TSST-1) e cinco enterotoxinas (A à E). Cerca de 30 a 50% de todas as cepas de *S. aureus* produzem uma enterotoxina (TRABULSI et al., 1999).

Staphylococcus spp. também podem ser transferidos de pessoa-a-pessoa, e esses microrganismos podem se estabelecer como membro da comunidade microbiana do hospedeiro. A transmissão interpessoal é importante no ambiente hospitalar, pois cepas colonizantes tornam-se fontes endógenas de infecções. Isolados de *S. aureus* podem ser introduzidos diretamente em locais estéreis durante procedimentos invasivos, como diálise, inserções de cateteres ou próteses, entre outros. Independente da origem do *Staphylococcus* spp. adquirido em associação com a assistência, a elevada prevalência das cepas resistentes a múltiplos antibióticos é uma preocupação constante em ambientes hospitalares (TRABULSI et al., 1999; CHAIMOWICZ et al.,1997; HIRAMATSU et al.,1999).

A bactéria *S. aureus* causa doenças por meio do resultado da ação de toxinas ou da invasão direta e destruição tecidual, produz uma ampla variedade de fatores de virulência. Infecções, mesmo superficiais, podem se tornar potencialmente fatais (TRABULSI et al., 1999).

1.1.7 Resistência aos antimicrobianos

Existem algumas bactérias que possuem mecanismos específicos de resistência que as caracterizam, permitindo assim a utilização desta característica para a sua identificação. Dentre os mecanismos de resistência existentes, pode ser citado as β - lactamases, as quais da classe A, são formadas por serina proteases com afinidade pela penicilina e apresentam atividade de amplo espectro. O gene

responsável por essas β - lactamases é encontrado no cromossomo ou em plasmídios, podendo apresentar regulação constitutiva ou induzida (KONEMAN et al., 2001; MOLAND et al.,1998).

A resistência do *S. aureus* hospitalar aos antimicrobianos é um problema antigo especialmente em relação à oxacilina. Nos dias correntes a quase totalidade das cepas origina-se a partir da incorporação de um elemento cromossômico (ZULIANI et al., 1972; ROBINSON et al., 2003). Atualmente, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos mecanismos de aquisição de resistência e os mecanismos moleculares da manifestação da resistência (JACOBY et al., 1998; JACOBY et al., 1991).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada por mutações ou transferência de genes de resistência. Esta transferência ocorre por meio dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, freqüentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (LACEY et al., 1973; LEVY et al., 1991; MACDONALD et al., 1966; SAUNDERS et al., 1984; SUASUNA et al., 1983; TRABULSI et al., 1973; ZULIANI et al., 1972).

S. aureus, coagulase-positivo ou coagulase-negativo, mostra elevada resistência (acima de 70%) à benzilpenicilina (penicilina G), bem como à penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (MOREIRA et al., 1995; STREIFEL et al., 1996; SCHWALBE et al., 1987). Para combater estes isolados foram descobertas as penicilinas antiestafilocócicas, tais como a meticilina e a oxacilina e seus derivados,

e as cefalosporinas de primeiras e segundas gerações. Contudo, logo após a introdução das primeiras penicilinas antiestafilocóccicas, surgiram bactérias deste gênero resistentes a elas, inicialmente na Europa, em 1961, e depois em outros países (BRUMFITT et al., 1989; HALEY et al., 1982; LACEY et al., 1973; MAPLE et al., 1989; MOREIRA et al., 1995). *S. aureus* vêm mostrando crescente resistência também a estes β-lactâmicos penicilinase-resistentes, registrando-se índices de resistência de 30 a 66%, em hospitais de grande porte (MOREIRA et al., 1995; SCWALBE et al., 1987). Em *S. aureus* denominados MRSA ou ORSA (siglas em inglês indicando *Staphylococcus aureus* meticilina ou oxacilina resistentes), o surgimento de genes de resistência possivelmente resultou de mutação e transposição entre os *Staphylococus spp.* (BOYCE et al., 1992; CHAMBERS et al., 1997; FRÂNCIOLLI et al., 1991; MULLIGAN et al., 1993; UBUKATA et al., 1985). No Brasil, tanto *S. aureus* como *S. epidermidis,* mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções por *S. aureus,* mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar (DUARTE et al., 1994; PINTO et al., 1996; RANGEL et al., 1995; SADER et al., 1998; SANTOS et al., 1994).

A resistência aos glicopeptídeos foi inicialmente observada em estafilococos que também mostravam resistência à meticilina e oxacilina e em pacientes submetidos anteriormente ao uso da vancomicina, o que indica a pressão de seleção de mutantes resistentes e não a transferência de genes de resistência de *Enterecocos* (WALDVOGEL et al., 1999).

O mecanismo mais comum pelo quais os genes de resistência são transferidos é a conjugação, aumentando dessa forma a disseminação desta

resistência no ambiente (GUILHERMATTI et al., 2001). O Subcomitê Internacional para Fagotipagem de *S. aureus* de origem humana, recomenda quatro grupos de bacteriófagos líticos para uso em rotina. Para realização da prova de fagotipagem, a amostragem estudo é semeada em uma placa de Agar-nutriente e tratada com uma suspensão dos diferentes bacteriófagos. A amostra é designada de acordo com o padrão de lise (MAC GOWN et al., 1985; TRABULSI et al., 1999).

O emprego de alternativas terapêuticas sem embasamento nos termos bacteriológicos primários, ou sem uma pesquisa nos dados da literatura médica, promove e potencializa a resistência aos antimicrobianos. A crescente prática de prescrição de antibióticos para pacientes ambulatoriais, aumentou a severidade das doenças nos paciente, quando hospitalizados, pela seleção prévia de resistentes. Aliada a este fato, os hospitais recebem um grande número de pacientes gravemente enfermos, transplantados, com falências de múltiplos ou imunodeficiência, portanto mais imunocomprometidos (BOYCE et al., 1991).

1.1.8 Agentes contaminantes

Isolados *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) são agentes importantes de infecções hospitalares, tendo como principais reservatórios os pacientes colonizados, a equipe de saúde e o ambiente hospitalar. As mãos da equipe de saúde pode se tornar transitoriamente colonizadas por *S. aureus*, sendo o principal veículo para sua transmissão cruzada.

As estratégias para o controle dos *Staphylococcus sp.* com resistência à vancomicina incluem as medidas universais de controle de infecção (luvas, cuidados com dejetos e secreções, lavagem das mãos), vigilância epidemiológica, isolamento, uso criterioso dos glicopeptídeos e tratamento dos pacientes infectados (WENZEL et al., 1998; SHLAES et al., 1997; CENTERS for CDC, 1997). Uma área problemática envolve antibacterianos (desinfetantes e antissépticos) que foram, incorporados aos produtos domésticos como sabões, detergentes para louça, loções, brinquedos e travesseiros. A população por meio da propaganda na mídia crê que esses antibacterianos podem esterilizar o ambiente doméstico e talvez erradicar as infecções. Os estudos mostraram que esses agentes podem produzir mudanças na comunidade bacteriana, contribuindo para a seleção de microrganismos, presentes nos ambientes (BOYCE et al., 1992).

Entre os principais grupos de contaminantes do ar em ambiente climatizado estão partículas microbianas, incluindo algas, fungos, bactérias, esporos e vírus, que são provenientes do ar externo, do sistema de climatização, da construção, mobiliário, carpete e, principalmente, de seus ocupantes (WORLD HEATH ORGANIZATION, 1998). A contaminação por essas partículas causa conseqüências adversas aos usuários, destacando-se infecções, reações alérgicas e irritantes, resultando em desconforto, doença, perda de produtividade e absenteísmo, entre outras (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

O Ministério da Saúde do Brasil aprovou a portaria nº 3.523, em 28 de agosto de 1998, devido a uma preocupação crescente no país que está associada à utilização de sistemas climatizados, tendo como objetivo reduzir o risco potencial à saúde dos usuários, com a permanência prolongada em ambientes dotados de sistemas de ar condicionado. Essa Portaria regulamenta a definição de parâmetros

físicos e composição física, química e biológica, suas tolerâncias e métodos de controle, bem como os pré-requisitos de projetos de instalação e de execução de sistemas de climatização (Ministério da Saúde Portaria nº 3523, 1998). A filtragem é um dos requisitos importantes no sistema de ar condicionado, pois é por meio dela que se obtém a pureza do ar (DANTAS et al.; 1998). Essa Portaria exige a utilização de, no mínimo, um filtro da classe G1, classificado como grosso, e com eficiência de 60-74% (ABNT, 1997). Em áreas que requeiram ventilação hospitalar, devem ser utilizados filtros absolutos capazes de reter microrganismos. Para obtenção de ar ultralimpo, implica em elevação dos custos de energia e também exige a utilização de pré-filtros, com uma eficiência em torno de 20-40%, anterior à passagem do ar em filtros absolutos. Em condições adequadas de instalação apresentam 100% de eficiência na remoção de partículas de 1-5 µm de diâmetro.

Os filtros HEPA (HIGH EFFICIENCY PARTICULATE AIR), apresentam 99,97% de eficiência. Esse sistema acarreta quedas de pressão mais intensas no sistema, em função de maior interferência no fluxo de ar (AMERICAN SOCIETY OF HEATING, 2001). No Brasil, os ambientes dotados destes filtros já foram regulamentados por meio da NBR 13.700, de junho de 1996, que é baseada na U.S. Federal Standard 209E de 1992 (ABNT, 1997). Dessa forma, se faz necessários estudos integrados incluindo pesquisadores da área básica, clínicos e epidemiologistas, para avaliação da aplicabilidade e a relação de custo-efetividade dos filtros nas diversas situações. Estes estudos auxiliarão no estabelecimento de limites de exposição para os usuários e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação desses contaminantes e poluentes, bem como a identificação de estratégias para a incorporação do monitoramento adequado do ambiente de interiores (STECZENBACH et al.,1998).

1.1.9. Infecções hospitalares

As infecções hospitalares de origem exógena são transmitidas por meio de contato direto e indireto, veículo comum, aerosóis e vetores. As infecções respiratórias estão juntamente com as urinárias e cirúrgicas, entre as síndromes infecciosas mais freqüentes em todos os países (MANTONE et al., 1998). No ambiente hospitalar é maior o risco de infecções de trato respiratório baixo (pneumonias), pela inalação de aerosóis contaminados, com menos de 5 µm de diâmetro (BRACHMAN et al., 1998) e, menos freqüentemente, em infecções pós-cirúrgicas que se originam na sala de cirurgia (NICHOLS et al., 1998). As infecções sobrevêm à deposição, sobre a ferida cirúrgica, de partículas contendo microrganismos (HAMBREAUS et al., 1998). Quartos de isolamento com ventilação especial estão indicados para pacientes com doenças infecciosas contagiosas, tais como herpes-zoster disseminado, varicela, sarampo e tuberculose pulmonar ou laríngea confirmada ou sob suspeita. Ventilação especial, também, é indicada para locais cujos procedimentos médicos produzem partículas aerosolizadas contendo agentes infecciosos, principalmente o bacilo da tuberculose. Os locais de maior risco são: sala de broncoscopia, de escarro induzido, unidade de terapia intensiva e sala de autópsia (HARRIES et al., 1997). A pressão negativa, seis ou mais renovações do ar por hora, janelas seladas, fluxo do ar no sentido do ambiente limpo para o sujo e filtração do ar com eficiência superior a 90% são exigidas nesses ambientes. É considerada como áreas "sujas", local onde se localizam os pacientes infectados tendo pressão negativa, ou seja, o ar retirado supera em 15% o fornecido. O filtro HEPA deve ser utilizado quando ocorrer recirculação do ar; assim, previne-se o

escape do ar contaminado pelo paciente para o restante do hospital e, também, reduz-se a concentração de microrganismos no interior da sala.

Os ambientes protetores ultra-limpos são referidos na literatura como isolamento com barreiras, ambiente protegido ou ambiente totalmente protegido (RHAME et al., 1986; RHAME et al., 1989; RHAME et al., 1998). As salas de cirurgia nos EUA são livres de bactérias ou partículas menores que 0,5 µm quando vazias. A fonte de bactérias presentes no ar em salas de cirurgia origina-se sobre tudo da pele das pessoas; e dessa forma, as contagens dependem principalmente do número de indivíduos, seu nível de atividade, sua disciplina e do conhecimento e aplicação das práticas de controle de infecções (HAMBREAUS et al., 1998). Em estudo realizado na cidade de Uberlândia em hospital público, a contagem em salas cirúrgicas limpas foi de 7,8 x 10^1 UFC/ml e de 2,3 x 10^2 UFC/ml nas salas sujas. Já em um hospital privado, com ar ultra limpo e refrigerado, foram observados 1,2 x 10^1 UFC/ml em salas limpas e 8,4 x 10^1 UFC/ml em salas sujas. Essas diferenças podem ser atribuídas a fatores como: proporções de cirurgias limpas (20% no hospital público universitário versus 87% nos hospitais privados) e eletivas (12% no hospital público universitário versus 94% nos hospitais privados), maior número de profissionais no ato cirúrgico e menor disciplina nas práticas de limpeza e desinfecção das salas no hospital público (MENEZES et al., 1999). Não foram determinados níveis que possam ser considerados seguros para a contaminação ambiental do ar de salas cirúrgicas para os diferentes procedimentos cirúrgicos (NICHOLS et al., 1998).

O sistema de fluxo laminar, compreendendo sistema de fluxo aéreo unidirecional, na direção vertical, fornece ar livre de partículas com mais de 0,3 µm de diâmetro (LEVENSON et al., 1986; LIDWELL et al., 1987). Dessa forma, um maior volume de ar filtrados, através de filtros de alta eficiência, introduzido por

entrada localizada no teto da sala, com força que permita a sua difusão, permite a obtenção de uma área ventilada em torno do sítio cirúrgico, que é constantemente "lavado" pelo fluxo de ar ultra limpo. Quanto maior a quantidade de objetos, tais como mesas e armários que interrompam esse fluxo aéreo, maior a turbulência e a possibilidade de altos níveis de contaminação (STREIFEL et al., 1996).

1.1.10 Padrões de partículas

Por meio da resolução de 3 de junho de 1990, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA et al., 1990), estabelece os padrões de qualidade do ar, nos ambientes externos que, ultrapassados, poderão afetar a saúde, a segurança e o bem-estar da população. Quanto às partículas inaláveis, os padrões primários e secundários são: concentração média aritmética anual de 50 $\mu g/m^3$ de ar, concentração de 150 g/m^3 por dia, que não deve ser excedida mais de uma vez por ano (CONAMA, et al., 1990). Nos EUA, a EPA (ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY) estabelece como padrão de exposição externa as partículas com menos de 2,5 μm e um limite de exposição de 65 μg por dia. Estudos recentes revelam que os níveis de poluição interna por produtos orgânicos voláteis e pesticidas tóxicos é maiores em ambientes internos do que externos e a exposição dos indivíduos a

partículas inaláveis durante o dia é mais alta (> 60%) do que à noite, tanto interna quanto externamente, em função da movimentação das pessoas (OTT et al., 1998).

As partículas não biológicas, provenientes da combustão do cigarro e de combustíveis, estão associadas a agravos na saúde, destacando-se os bioaerossóis, que correspondem a material biológico transmitido pelo ar. Os contaminantes biológicos incluem microrganismos (bactérias, fungos, vírus), ácaros, pólen, traças, pêlo e fezes de animais. As bactérias e fungos são os mais freqüentemente associados com biocontaminantes e com queixas quanto à qualidade de ar de interiores. *Staphylococcus spp.* e *Micrococcus spp.* estão entre os contaminantes bacterianos mais freqüentes, e entre os fungos destacam-se: *Penicillium spp., Aspergillus spp.* e *Cladosporium spp*. As principais fontes de contaminação fúngica estão nos sistemas de ventilação mecânica, em função do seu funcionamento deficiente e de misturar ar filtrado externo com ar reciclado (STECZENBACH et al., 1998; BUTTNER et al., 1993).

No Brasil há uma proposta de Kulcsar Neto e Siqueira (KULSCAR et al., 1998) para um "padrão referencial brasileiro", o qual corresponderia a 780 UFC/m^3 de ar. Os níveis de contaminantes biológicos do ar de interiores variam em função do tempo e espaço, de forma que um banco de dados sobre a distribuição de níveis de contaminação deve ser suficientemente grande para fornecer informações úteis para a gerência de risco. A natureza da coleta e análise é muito dependente de diferenças nas condições ecológicas (clima, estação do ano e geografia) (WORLD HEATH ORGANIZATION, 1998).

Nos métodos de coletas, envolvem a passagem forçada do fluxo de ar em um dispositivo especial (amostrador de Anderson), onde os microrganismos (fungos e bactérias) são depositados sobre a superfície de meios bacteriológicos,

onde são feitas as contagens. A análise final compreende vários dias e muitos microrganismos não são cultiváveis sem o uso de meios ou condições de cultivo especiais (JENSEN et al., 1994; BUTTNER et al., 1997). Devido à falta de métodos e padrões, amplamente aceitos, para análise e amostragem de agentes microbianos no ar, é difícil o estabelecimento de padrões destes agentes suspensos no ar de interiores (WORLD HEATH ORGANIZATION, 1998).

O material particular inalado é amostrado por meio da passagem do ar por filtros (3,5 µm) de policarbonato, conectados a um ciclone, instalado antes do filtro; funciona da mesma forma que um aspirador de pó, deixando passar apenas as partículas menores. O material particulado é determinado gravimetricamente por meio de uma balança de precisão com sensibilidade na faixa de micrograma (CONNER et al., 1990). Os estudos de exposição têm-se concentrado na avaliação da prevalência de compostos orgânicos voláteis, pesticidas, monóxido de carbono e partículas inaláveis (dimensões inferiores a 2,5 µm); estas partículas podem atingir o trato respiratório inferior, sendo, portanto, mais associadas a doenças pulmonares (OTT et al., 1998).

Os inquéritos de monitoramento do ambiente interno deveriam ser usualmente, recomendados quando da comprovação, por médicos, de doença com a ocupação do ambiente, evidência visual (presença de turbidez), queixa dos ocupantes, que sejam sugestivas de contaminação biológica (STECZENBACH et al., 1988).

Como as relações entre dose/exposição por biocontaminantes de interiores são usualmente pouco conhecidas (STECZENBACH et al., 1988), estudos integrados, incluindo pesquisadores de área básica, clínicos e epidemiologistas, são necessários para: a) auxiliar no diagnóstico de doenças; b) estabelecer limites de

exposição para os usuários; c) definir qualidade aceitável para o ar de interiores; d) estabelecer protocolos e estratégias para o monitoramento do ambiente de interiores e) avaliar a aplicabilidade e relação de custo/efetividade das medidas, nas diversas regiões do Brasil.

1.1.11 Saúde Pública

O envelhecimento da população resulta em um aumento gradual nos custos em saúde, principalmente devido aos casos de internação de idosos que se tornam mais freqüente. Doenças crônicas – degenerativas, geralmente são mais onerosas para o sistema de saúde, mantendo como exceção os recém-nascidos, que fazem o uso intenso de tecnologia. Processos agudos se resolvem rapidamente com a cura ou óbito, as doenças crônicas e suas complicações podem significar anos de utilização dos serviços de saúde, medicamentos, consultas médicas e internações hospitalares de longa duração. As seqüelas de acidente vascular cerebral, fraturas após quedas, insuficiência cardíaca, doenças pulmonares, cegueira e amputações provocadas por diabetes e demência de Alzheimer, contribuem significativamente com o elevado custo no sistema de saúde, assim como proporciona o uso de diversos medicamentos e antimicrobianos (CHAIMOWICZ et al., 1997). O aumento na permanência do paciente em UTI resulta em 5% de infecção adquirida (WENZEL et al., 1998), e estas geram uma grande preocupação para as instituições, principalmente quando o tempo de internação é

prolongado, gerando a elevação do consumo de medicamentos e aumento de custos para os órgãos administrativos (ALEGRE et al., 2000).

As bactérias que prevalecem em pacientes hospitalizados em UTI principalmente em infecções respiratórias são: *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus* (TOUFEN et al., 2003). A seleção de isolados bacterianos resistentes aos antimicrobianos é crescente em pacientes internados em UTI devido a maneira precoce e empíria do uso de antibióticos de largo espectro (MARTINS et al., 2004).

A resistência a quimioterápicos, antimicrobianos e a virulência de alguns agentes podem ser relacionados à habilidade e versatilidade carregada por elementos extracromossomais (plasmídeos e fagos) e transferida entre organismos por conjunção transdução ou transformação. Os antimicrobianos e quimioterápicos são de grande importância quando originados da microbiota normal e selecionados pelo uso indiscriminado de quimioterápicos (HALEY et al., 1982; COSGROVE et al., 2003).

A sobrevivência dos microrganismos em ambientes diversos e a sua capacidade de resistência às drogas antimicrobianas são de considerável importância na alteração do comportamento epidemiológico de doenças isoladas de *S. aureus* resistentes, visto que foram constatadas desde a década de 1950 e desde então inúmeras infecções hospitalares tem sido associados com bactérias emergentes ou reemergentes, resistente aos glicopeptídeos GISA, MRSA, ORSA (HIRAMATSU et al., 1999).

As lesões humanas de pele, vias respiratórias e fomites contaminados são consideradas as principais fontes de infecção. De modo geral, nos hospitais as infecções e propagação por contato assumem maior importância,

por parte da equipe de profissionais e devido a resistência de cepas encontradas nos pacientes (COSGROVE et al., 2003). A resistência de isolados de *S. aureus* à penicilina, tetraciclina, aminoglicosideos e eritromicina também estão sendo observadas (COSGROVE et al., 2003).

A letalidade atribuída à infecção hospitalar da corrente sanguínea e a concomitância com infecções em outros sítios como: pulmão, coração, sistema nervoso central como parte de entrada ou complicações de sepses costumam estar associadas a parte de entrada do uso de cateter venoso central. O aumento da permanência na internação hospitalar, e o aparecimento de sepses, principalmente em pacientes internados na UTI descrita em serviços de controle e prevenção da infecção hospitalar (MOREIRA et al., 1995).

Dessa forma, o monitoramento de populações microbianas contaminantes de ambiente hospitalar e a sua variação genética, ao longo de um período pode resultar em informação de grande importância para o desenvolvimento de programas de controle da infecção hospitalar.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo geral:

- O objetivo deste estudo foi a análise da diversidade bacteriana, em especial *Staphylococcus aureus,* de ambientes clínicos hospitalares.

2.1.2 Objetivos específicos

- Levantamento de isolados clínicos provenientes do Hospital Dr. Osíris Florindo Coelho (HDOFC), Mogi das Cruzes, SP, Brasil;
- Identificação e caracterização de isolados por meio de provas bioquímicas e microbiológicas e sensibilidade a antibióticos,
- Caracterizar geneticamente isolados de *S. aureus* por meio da técnica de ARDRA;
- Avaliar correlação entre características genéticas, fisiológicas, com a época de amostragem e ambiente de isolamento.

3 MÉTODOS

3.1 Isolamento de bactérias de ambiente clínico.

3.1.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas entre Janeiro de 2002 à Dezembro 2004, no Hospital Osíris Florindo Coelho, Ferraz de Vasconcelos – São Paulo – Hospital da Rede Pública Estadual de Saúde. Foram amostrados materiais de diferentes ambientes tais como ar condicionado dos setores de bioquímica, hematologia e sorologia; amostras de bancada de trabalho, microscópio, centrífuga e amostras clínicas (pacientes), provenientes de: sangue, urina, fezes, secreções diversos e líquidos cavitários conforme demonstrado em fluxograma (Figura 1).

As amostras clínicas foram coletadas por um auxiliar de enfermagem dos diversos setores do Hospital e encaminhadas ao setor de microbiologia do laboratório. Para isolamento, as amostras foram semeadas nos meios de cultura (sólido e líquido) agar-sangue, manitol e MacConckey (Merck) e incubados em estufa a 37ºC por até 48 horas. Após crescimento bacteriano, os isolados foram caracterizados por meio de provas bioquímicas e testes de sensibilidade a antibióticos.

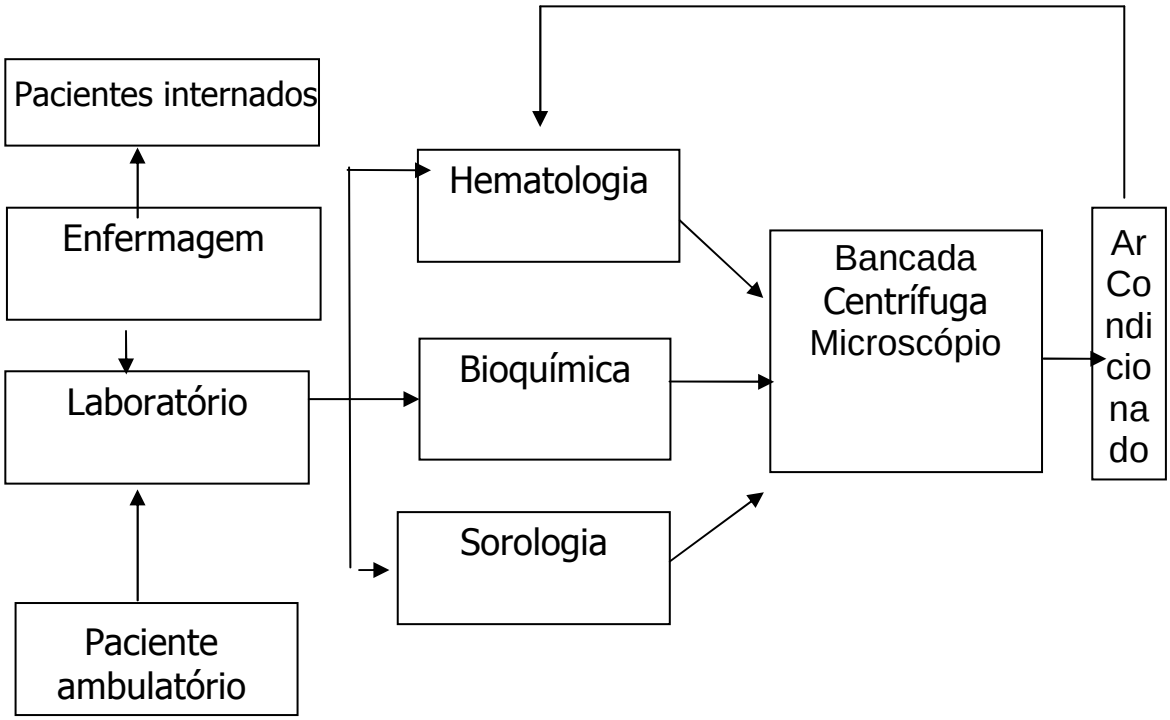

Figura 1: Fluxograma da coleta de amostras clínicas e de ambiente do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos.

3.1.1.1 Descrição do procedimento para realização das coletas das amostras clínico-hospitalares.

- Ao iniciar o plantão, bancadas, microscópio e centrífuga eram limpos com hipoclorito a 1% e álcool a 70%.
- As amostras provenientes das coletas de pacientes começam a chegar aos respectivos setores para processamento.
- Foram realizadas as coletas das amostras de superfície (bancada, microscópio e centrífuga) e semeadas sobre meio de cultura adequado (item 3.1.1); posteriormente foram transportadas ao setor e mantidos em estufa microbiológica a 37 ºC, conforme protocolo para verificação do crescimento bacteriano e posterior identificação do microorganismo.

- As amostras coletadas do filtro do ar condicionado dos setores de (Bioquímica, Sorológico e Hematológico) foram obtidas quinzenalmente.

3.1.2 Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram identificados com auxílio do Sistema Automatizado MicroSCAN® (Dade Behring, CA, USA) que consiste na utilização de painéis para determinação de susceptibilidade a agentes antimicrobianos e a identificação de espécies de bastonetes Gram negativo aeróbios e anaeróbios facultativos (DADE BEHRING, 2002). Dessa forma, para identificação de *S. aureus* foram utilizados testes bioquímicos, tolerância a agentes físicos e químicos, catalase e coagulase.

Para identificação bacteriana, neste estudo, foram utilizados métodos semi-automatizados, que são métodos que empregam programas para a análise dos resultados. Neste caso, as provas bioquímicas, são em geral contidas em sistemas miniaturizados, como painéis ou placas de plástico, de tamanho padronizado, nas quais estão incluídos até 32 substratos reativos desidratados. Após inoculação, incubação e adição de reativos, quando necessário, a leitura é realizada utilizando um leitor automático de placas, para detectar crescimento bacteriano ou as mudanças de coloração por diferenças de transmissão de luz. As diferenças de pulsos eletrônicos são analisadas automaticamente por um microcomputador que compara padrões de reação com um programa interno para determinar a probabilidade das identificações (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002). A

produção de coagulase pode ser demonstrada pela incubação de uma mistura de *S. aureus* com plasma diluído (humano ou de coelho).

Para identificação, as bactérias isoladas foram diluídas em 25 mL de Água Pluorinic - D® e agitadas. Após homogenização essa suspensão foi derramada na parte superior da bandeja, a tampa com 96 pontas foi colocada, e com pipetador (RENOK®), foi aspirado e inoculado no painel (Positivo Combo Panel Type 20). O painel foi fechado com a tampa de cobertura e incubado a 35ºC por 15 a 24 horas. Após o período de incubação, com dados das reações bioquímicas obtidas por testes cromogênicos e baseados na mudança de pH, utilização de substratos e crescimento na presença de agentes antimicrobianos, os isolados foram identificados por meio da leitura automatizada no leitor de painéis auto - SCAN-4® pelo programa DMS® (Data Management System) que converteu os dados dos resultados de 24 testes deste painel, transformando-os em um número de 8 dígitos (biótipos) que foram comparados com o banco de dados do programa. A partir destes dados procedeu-se a identificação e a probabilidade relativa dos espécimes identificados (DADE BEHRING, 2002).

3.1.3. Provas bioquímicas do sistema MicroSCAN®

Carboidratos - A identificação inicial com a fermentação de carbohidratos específicos (glicose, sacarose, sorbitol, rafinose, ramnose, arabinose, inositol, adonitol e melibiose), os quais resultam na formação de ácidos, e a redução do pH

pelo indicador vermelho fenol, o qual adquire uma coloração amarela em pH ácido (KONEMAN et al, 2001; DADE BEHRING, 2002).

Uréia - a enzima urease hidrolisa a uréia formando amônia, a qual pode ser detectada pela alcalinização do meio com mudança de vermelho para rosa na coloração do vermelho fenol (KONEMAN et al, 2001; DADE BEHRING, 2002).

Sulfeto de Hidrogênio - o gás sulfeto de hidrogênio (H_2S) é produzido a partir do tiossulfato de sódio e reage com íons de ferro do meio, produzindo um precipitado preto (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

Indol - O metabolismo do triptofano resulta na formação do indol que é detectado pela adição do reativo de Kovac's (p-dimetilaminobezaldeído). Se o indol esta presente, desenvolve-se uma coloração vermelha. A descarboxilação de aminoácidos (arginia, lisina, ornitina) resulta na formação de aminas que foram detectadas pelo indicador de pH púrpura de bromocresol. O resultado positivo foi caracterizado por uma coloração púrpura (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

Triptofano Desaminase - Bactérias capazes de desaminar o triptofano produz ácido indol pirúvico, que reage com citrato férrico amoniacal do meio e após adição do cloreto férrico, produziu uma coloração marrom (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

Hidrólise da Esculina - A hidrólise da esculina produz glicose e esculetina que foi detectada pelo citrato férrico amoniacal do meio, que reagiu com os produtos hidrolíticos (esculetina), formando um precipitado preto (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

Voges-Proskauer - A acetoína é produzida a partir do piruvato de sódio, o qual resulta em uma coloração vermelha, após adição de hidróxido de potássio a 40% e alta-naftol a 5% (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

Galactosidade - A Beta-galactosidase hidrolisa o orto-nidrofenil -β -D-galactopiranosideo, com liberação de orto-nitrofenol de cor amarela. Esta prova detecta a fermentação tardia de lactose (KONEMAN et al, 2001; DADE & BEHRING, 2002).

Colistina - Resistência a concentrações específicas de Colistina (4μg/mL) foi avaliada por turvação do meio de cultura Caldo Mueller –Hinton (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

Citocromo Oxidase - Os citrocromos são hemoproteínas que contém ferro e atuam como último elemento de ligação na cadeia respiratória aeróbia, transferindo elétrons (hidrogênio) ao oxigênio, com formação de água. A prova da oxidase é importante para identificação de colônias que supostamente pertencem a alguma das *enterobacteriaceae* (todas negativas). A prova de citocromo oxidase utiliza certos corantes, como o que substitui o oxigênio como aceptor artificial de elétrons. No estado reduzido, o corante é incolor. Entretanto, em presença de oxidase e de oxigênio atmosférico, a p-fenilenodiamina é oxidada em forma azul-di-indofenol (KONEMAN et al., 2001).

3.1.4 Análise de antibiograma

Para a análise de resistência/susceptibilidade dos isolados a diferentes antimicrobianos, foram utilizados equipamentos automatizados para realização de testes de avaliação, empregado painéis ou placas com número determinado de antibióticos desidratados com concentrações pré-estabelecidas. Essa metodologia oferece um CMI (Concentração Mínima Inibitória) aproximada, já que existem diferentes concentrações para cada antimicrobiano' (MOLAND et al., 1998; THOMSON et al., 1999; KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002).

O teste de susceptibilidade a antimicrobiano caracterizou-se pela miniaturização de testes de susceptibilidade por diluição em caldo dos antimicrobianos de interesse (Tabela 2). Estes antimicrobianos são diluídos em Caldo Mueller-Hinton (Dade Bering®, CA, USA) suplementado com cálcio e magnésio em concentrações de interesse clínico. O ponto do corte usado equivale à padronizado pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Após inoculação e reidratação com suspensão do organismo padronizado e incubado a 35ºC por no mínimo 16 horas (média de 24 horas), a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do organismo testado foi determinada pela observação da mais baixa concentração do antibiótico que inibe o crescimento bacteriano (KONEMAN et al., 2001; DADE BEHRING, 2002; NAHAS et al., 2002) (Tabela 3).

A susceptibilidade foi determinada pela comparação da CMI do microrganismo com o nível atingível do antimicrobiano no sangue ou na urina, segundo documento do NCCLS–ABSA (NATIONAL COMMENS FOR CLINICAL LABORATORY SANTANDRS, 2004).

Tabela 2 Classificação dos Antibióticos Utilizados

Clase	**Grupo**	**Antibiótico**
ß-Lactâmico	Aminopenicilina	Ampicilina (Am)
	Ureidopenicilina	Pipepracilina (Pi)
	Cefalospirina 1º geração	Cefalotina (Cf) Cefazolina (Cfz)
	Cefalosporina 2º Geração	Cefuroxima (Crm)
	Cefamicina	Cefotetan(Ctn)
	Cefalosporina 3º Geração	Cefotaxima (Cft) Cefpodoxima (Cpd) Cefatazidima (Caz) Ceftriaxona (Cax)
	Cefalosporina 4º Geração	Cefepime (Cpe)
	Carbapenem	Imipinem (Imp)
	Inibidor de ß-Lactamase	Ticarcilina/Ac;Clavulâmico(Tim Ampicilina/Sulbactam(A/S) Piperacilina/Tazobactan(P/T)
Aminoglicosídeo		Amicacina (Ak) Gentamicina(Gm) Tobramicina(To)
Quinolona		Ciprofloxacina(Cp) Ofloxacina(Ofx)
Inibidor de Ácido Fólico		Trimetoprim/Sulfametoxazol (T/S)

Tabela 3. Ponte de Corte para interpretação do Antibiograma (MIC - µ/mL) em: Sensível, Intermediário e Resistente**.**

Antibiótico	**Sensível**	**Intermediário (I)**	**Resistente(R)**
Ampicilina (Am)	≤8	16	≥32
Piperacilina(Pi)	≤616	32-64	≥128
Cefalotina(Cf)	≤8	16	≥-32
Cefazolina(Cfz)	≤8	16	≥32
Cefuroxima(Crm)	≤8	16	≥32
Cefotetan(Ctn)	≤16	32	≥64
Cefotaxina(Cft)	≤8	16-32	≥64
Cefpoddoxima(Cpd)	≤2	4	≥8
Ceftazidima(Caz)	≤8	16	≥32
Ceftrixona(Cax)	≤8	16-32	≥64
Cefepime (Cpe)	≤8	16	≥32
Imipinem(Imp)	≤4	8	≥16
Ticarcilina/Ac.Clavulâmico (Ti32m)	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2
Ampicilina/Sulbactam(A/S)	≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacilina/Tazobactam(P/T)	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Amicacina(Ak)	≤16	32	≥64
Gentamicina(Gm)	≤4	8	≥16
Tobramicina(To)	≤4	8	≥16
Ciprofloxacina(Cp)	≤1	2	≥4
Ofloxacina(Ofx)	≤2	4	≥8
Trimetoprim/Sulfametoxazol(T/S)	≤2/38	---	≥4/76

3.2 Caracterização Molecular

3.2.1 Extração de DNA genômico total

Os isolados foram inoculados em 5 ml de meio de cultura LB e incubados por 18 horas a 37^{0}C. Após esse período, a cultura bacteriana foi colocada em tubos de 2,0 mL, centrifugada por 5 minuto a 9700xg, e em seguida o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 500 μl de TE (Tris-HCl 1M pH 7,5, 10 mL; EDTA 0,5M pH 8,0, 2 mL; água destilada, 1000ml) e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e novamente ressuspendido em 500 μl de TE sendo adicionados 30 μl de SDS 10%, mais 0,5 g de sílica com agitação no "bead beating" (Biospec products) por 45 segundos. Após a agitação foram adicionados 200 μl de fenol saturado e clorofórmio 200μl, homogeneizado e centrifugado (9700xg por 10 minuto). A fase superior foi transferida para um novo tubo (470μl) e acrescido 450μl de clorofórmio e centrifugando por 5 minutos. A esta suspensão foram adicionados 200μl de fenol e 200μl clorofórmio, a solução foi homogeneizada por inversão e posteriormente centrifugada a 9700xg por 5 minuto. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,1 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol, incubado por 5 minuto a temperatura ambiente e em seguida centrifugado por 10 minuto a 9700xg. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado com 400 μl de etanol 70% e centrifugado por 2 minuto a 9700g, o sobrenadante foi removido, o DNA foi seco a 37^{0}C, ressupendido em 100 μl de água Milli-Q autoclavada e estocado a –20 ^{0}C.

3.2.2 Amplificação do 16S rDNA das bactérias

A amplificação é realizada em termociclador PTC – 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research), programado para uma desnaturação inicial a 94º C por 4 minutos; 30 ciclos de desnaturação (94ºC por 30 segundos), anelamento (62,5ºC por 1 minuto) e extensão (72ºC por 1 minuto) e uma extensão final a 72ºC por 5 minutos. A amplificação foi avaliada por meio de eletroforese de 5μL da reação de PCR em gel de agarose (1%) (SAMBROOK et al., 1989).

3.2.3 Clivagem do gene 16s rDNA com enzimas de restrição

A clivagem do gene 16S rDNA foi realizada utilizando a enzima de restrição *Mbo I.* A reação de digestão foi realizada a 37^0 C por 2 horas, num volume final de 11μl, contendo 1μg do produto de PCR, 2 U da enzima de restrição juntamente com o tampão da enzima, de acordo com as instruções do fabricante.

Após a digestão, toda a reação foi corrida em eletroforese em gel de agarose a 1,7% (2,5v/cm), juntamente com o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio, observado sobre luz ultravioleta e foto documentado. Os padrões de bandas obtidos foram analisados visualmente para agrupar os isolados.

3.2.4 Análise da variabilidade genética por ARDRA

Para caracterização da variabilidade genética das bactérias estudadas foi utilizada a técnica de ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis). Para tanto, a enzima de restrição *Mbo*I foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante (MBI Fermentas). A clivagem foi realizada em um volume final de 13µL contendo 2 µg de produto de PCR e 2U da enzima de restrição. A reação foi incubada a 37ºC por 2 horas. Após este período, todo o produto da reação juntamente com tampão de corrida, foi aplicado em gel de agarose a 2,5% e submetido à eletroforese a 1,5 $V.cm^{-1}$. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etílio e fotografado sobre a luz ultravioleta (UV) (SAMBROOK et al., 1989).

4 Resultados e Discussões

4.1 Isolamento de bactérias em ambiente hospitalar

A contaminação bacteriana em diferentes ambientes do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos-São Paulo foi monitorada durante os anos de 2002, 2003 e 2004. Foram obtidas 2821 bactérias as quais após identificação bioquímica mostrou que as espécies *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, K. pneumoniae, Micrococcus sp., Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. sciuri, S. simulans, S. xylosus, S. warneri* e *Vibrio fluvialis* foram as mais freqüentes nos ambientes amostrados. Destas, foram obtidas 2625 isolados clínicos, enquanto que de ar condicionado e superfície foram obtidos apenas 89 e 107 isolados, respectivamente (Tabela 04).

No presente trabalho foi verificado que a espécie *E. coli* foi a mais freqüente em isolados de amostras de pacientes, enquanto *S. aureus* foi o mais freqüente nos ambientes de superfície e de ar condicionado durante o período avaliado. Também foi observado que *S. aureus, S. simulans, S. xylosus* e *E. cloacae* foram freqüentes em quase todos os ambientes amostrados e períodos avaliados. Foi observado também que *V. fluvialis* e *S. epidermitis* foram observados somente em superfície, enquanto *P. mirabilis* foi isolado somente de pacientes clínicos (Tabela 04).

Tabela 4. Diversidade dos isolados em diferentes ambientes nos períodos de 2002; 2003 e 2004 do Laboratório do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos.

Espécies	População relativa de bactérias								
	Ar condicionado			Superfície			Clínicos		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004	2002	2003	2004
Escherichia coli	0	0	0	21%	13%	19%	32%	32%	33%
Staphylococcus aureus	12%	0	43%	29%	16%	29%	8%	11%	12%
S. epidermidis	0	0	0%	0%	0%	0%	8%	7%	7%
S. haemolyticus	0	19%	3%	0%	0%	8%	7%	3%	2%
Klebisiella pneumoniae	0	0	0%	0%	10%	8%	5%	6%	5%
Proteus mirabilis	0	0	0%	0%	0%	0%	4%	3%	3%
Enterobacter cloacae	0	27%	9%	14%	0%	13%	3%	3%	4%
S. sciuri	24%	0	14%	0%	0%	0%	225%	0%	0%
S. simulans	47%	14%	20%	18%	19%	2%	2%	0%	0%
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0%	0%	0%	0%	2%	2%	1%
S. xylosus	18%	24%	6%	0%	26%	4%	2%	2%	2%
E. aerogenes	0	0	0%	0%	0%	0%	1%	3%	3%
Enterococcus faecalis	0	0	0%	0%	0%	0%	1%	3%	20%
S. warneri	0	0	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%
Klebisiella oxytoca	0	0	0%	14%	0%	8%	0;65%	1%	12%
Micrococcus sp.	0	16%	6%	0%	6%	2%	0%	0%	0%
Vibrio fluvialis	0	0	0%	4%	10%	6%	0%	0%	0%
Outras bactérias	0	0	0%	0	0	0	20%	22%	24%
Total de isolados	17	37	35	28	31	48	1065	710	850
		89			107			2625	

Embora *V. fluvialis* e *Micrococcus* sp. tenham sido isolados como contaminantes de ar condicionado e/ou superfície, não foram obtidos a partir de amostras de pacientes (clínicos), enquanto que *E. aerogenes, E. faecalis, P. aeruginosa, S. epidermidis* e *P. mirabilis* não foram obtidos nos ambientes avaliados, mas estavam presentes em pacientes. Estes resultados mostram que para alguns grupos, pode não existir correlação entre a sua presença em ambiente hospitalar e a sua contaminação em pacientes. Neste caso deve ser sugerido que para os pacientes avaliados, a fonte primária de infecção pode ter sido o ambiente externo ao hospital.

Em ar condicionado, *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis, S. haemolyticus, S. sciuri, S. simulans, S. xylosus, S. warneri*) *S. aureus, E. cloacae* e *Micrococcus sp.* foram os grupos mais importantes durante o período avaliado, apresentando variação que parece não depender do trimestre e ano avaliado (Figura 02). Entretanto, foi possível observar que no segundo e terceiro trimestre de 2002, somente *Staphylococcus* spp., excluindo *S. aureus,* foram isolados deste ambiente, mostrando que pode ter ocorrido uma intensa entrada destas espécies no ambiente hospitalar. Além disso, embora este pareça ser o grupo contaminante mais importante, no primeiro e quarto trimestre de 2004, *S. aureus* foi o grupo mais importante neste ambiente, compondo 50% dos isolados obtidos (Figura 02).

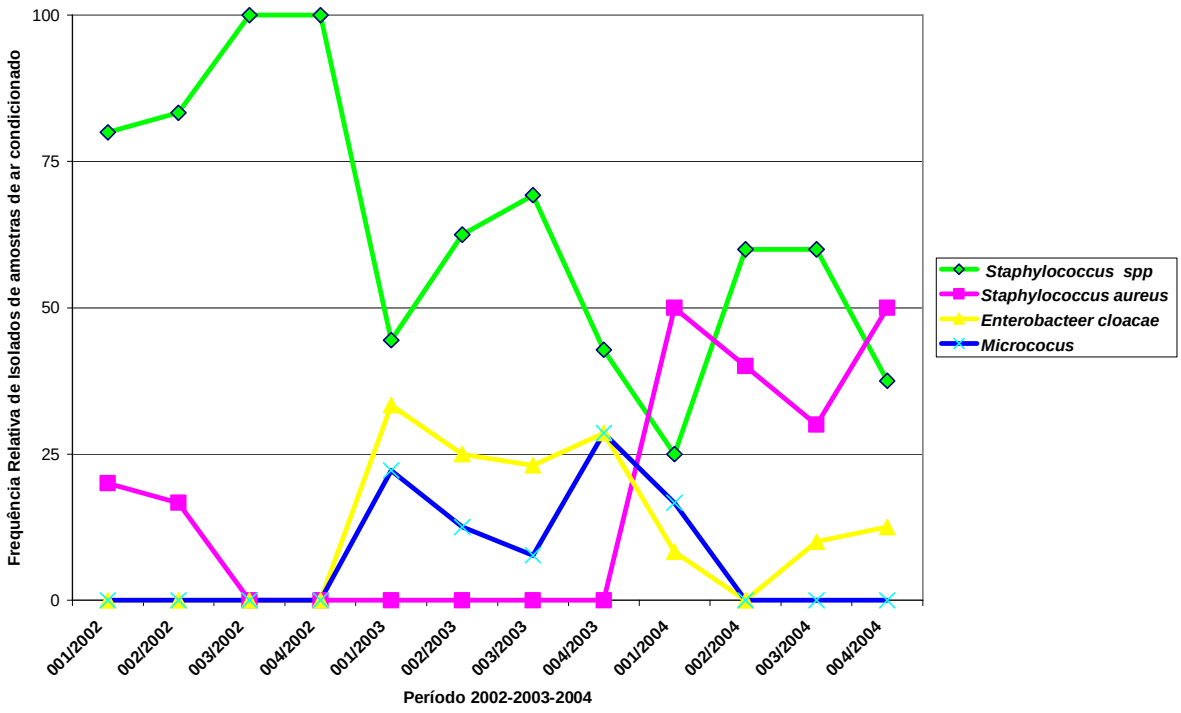

Figura 02. Variação na freqüência relativa de *Staphylococcus spp.* (*S. simulans; S. siuri; S. xylosus; S. warneri e S. haemolyticus*), *S. aureus, E. cloacae* e *Micrococcus* sp. de Ar condicionado do Laboratório do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos, referente ao período de amostragem 2002, 2003 e 2004. Foram avaliados 89 isolados.

Em amostras de superfície hospitalar, foi observado que *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis, S. haemolyticus, S. sciuri, S. simulans, S. xylosus, S. warneri*), *S. aureus, E. cloacae, E. coli* e *Micrococcus sp.* foram os grupos mais importantes durante o período avaliado, apresentando variação que parece não depender do trimestre e ano avaliado (Figura 03). Embora, *S. aureus* tenha sido mais freqüente em 2002 e 2004 (2 trimestres em cada ano), enquanto que *Staphylococcus* spp., excluindo *S. aureus,* foram mais freqüentes em 2003. Já *E. cloacae* esteve ausente no período entre 04/2002 a 04/2003, enquanto *Micrococcus* sp. esteve presente apenas em 01/2003, 02/2003 e 04/2004 (Figura 03). Estas variações parecem não estar associada à variações climáticas, mas pode depender de fontes de contaminantes externas, as quais seriam responsáveis por introduzir bactérias no ambiente hospitalar (Figura 03).

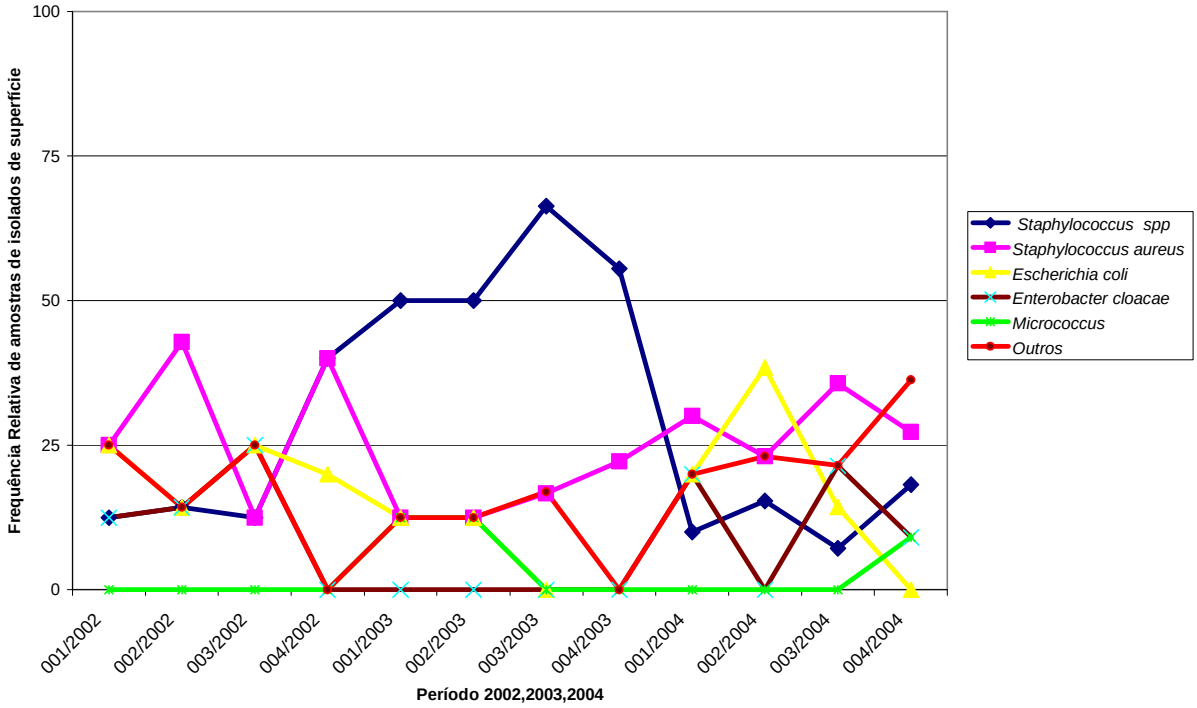

Figura 03. Variação na freqüência relativa de *Staphylococcus spp.* (*S. simulans; S. siuri; S. xylosus; S. warneri e S. haemolyticus*), *S. aureus, E. cloacae, E. coli* e *Micrococcus* sp. de superfícies do Laboratório do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos, referente ao período de amostragem 2002, 2003 e 2004. Obs.: outros incluem *K. pneumoniae, K. oxitoca* e *V. fluviais.* Foram avaliados 107 isolados.

Segundo Dancer et al. (2004) a transmissão de *S. aureus* ocorre por meio de mãos contaminadas e aerosois em superfície. Há uma classificação em hospitais de acordo com o risco associado a infecções, sendo críticos, semi-críticos e não críticos. As superfícies estão relacionadas com o item não-crítico, ou seja, não entram em contato com o paciente, representando um baixo risco de infecção (SPAUNDING et al., 1968).

Há evidencias de que o ambiente hospitalar possa representar um reservatório secundário de bactérias Gram-positivas (*S. aureus, Enterococcus spp e* Gram-negativas, *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae*) resistente a antibióticos, por sobreviver às condições adversas existentes em superfícies secas (RUTALA et al., 2002; COZAD et al., 2003).

Em amostras de pacientes do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos foi observado que *E. coli* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada em todas as épocas avaliadas seguido de *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis, S. haemolyticus, S. sciuri, S. simulans, S. xylosus, S. warneri*), *S. aureus, E. cloacae* e *K. pneumoniae* (Figura 04). Pouca variação foi observada na relação entre as espécies no período amostrado.

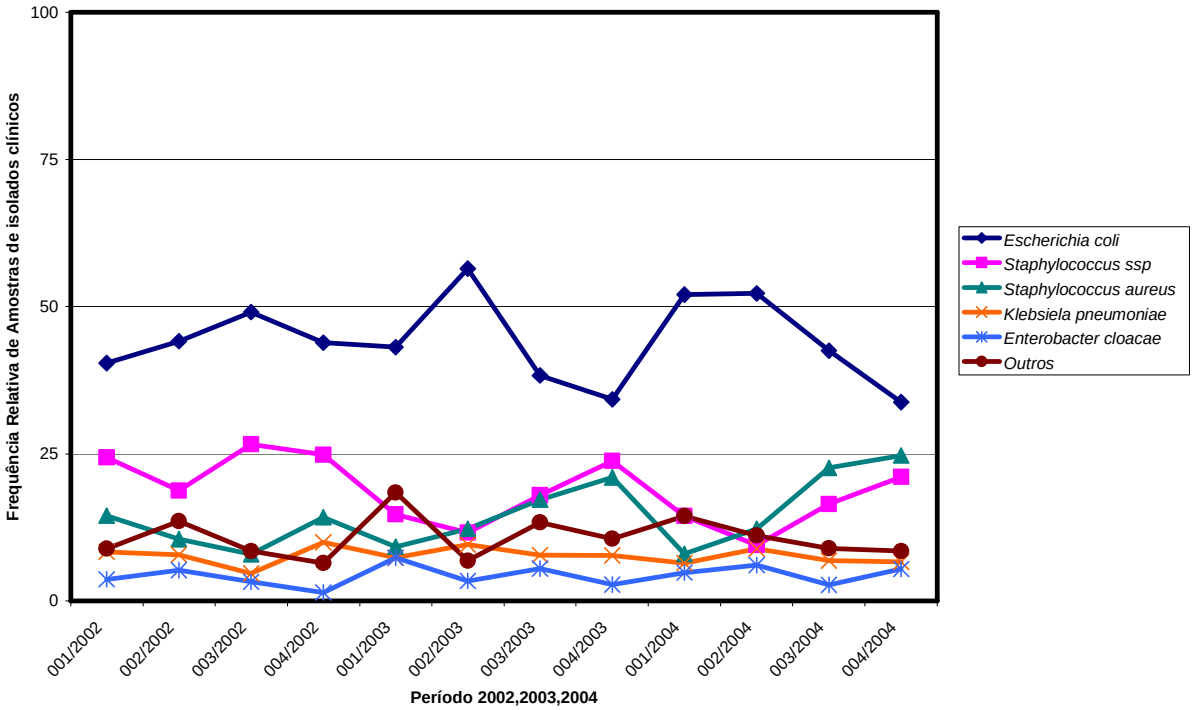

Figura 04. Variação na freqüência relativa de *Staphylococcus spp.* (*S. simulans; S. siuri; S. xylosus; S. warneri e S. haemolyticus*), *S. aureus, E. cloacae, E. coli* e *K. pneumoniae* de pacientes do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos, referente ao período de amostragem 2002, 2003 e 2004. Obs.: outros incluem *K. oxytoca, V. fluviais, P. aeruginosa, E. aerogenes, Proteus mirabilis, E. faecalis* e *Micrococcus sp.* Foram avaliados 2625 isolados.

4.2 Caracterização de *Staphylococcus aureus*

4.2.1 Isolamento

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que *E. coli* foi a espécie de maior incidência, mas *S. aureus* foi a espécie de maior distribuição, sendo observada em todos os ambientes e nos 3 anos amostrados (Figura 5). Neste contexto, *S. aureus* é encontrado como componente da microbiota normal do ser humano, sendo encontrado em várias partes do corpo tais como fossas nasais, mãos, garganta e intestino, podendo ser transmitido de pessoa para pessoa (infecção cruzada), por meio do contato indireto (via aérea) ou por contato direto, estando esta transferência na dependência da presença de uma fonte (doentes ou portadores) (SANTOS et al., 1994). A colonização não é uniforme e distribui-se pelas diferentes partes do corpo que estão em contato com meio externo, principalmente pele e mucosas.

No presente trabalho *S. aureus,* manteve-se presente em todo o período avaliado, nas amostra s coletadas de superfície, com exceção do 1º, 2º e 3º Trimestres de 2003, onde a prevalência de *Staphylococcus* spp é maior (66,33%) conforme demonstra a figura 02. Analisando a figura 5, parece não haver correlação entre a freqüência de *S. aureus* nos 3 ambientes avaliados nos anos de 2002, 2003 e 2004, visto que embora a freqüência de isolamento de pacientes tenha se mantido estável, ocorreu grande variação na freqüência desta bactéria de superfícies e ar condicionado.

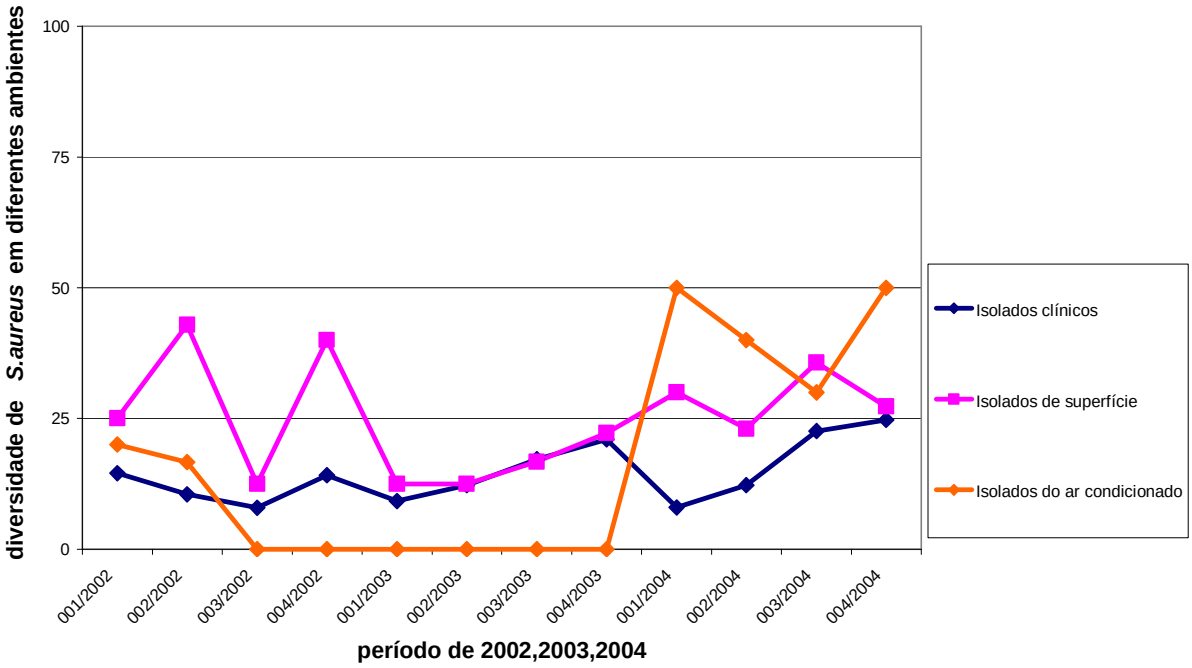

Figura 05: Distribuição de *S. aureus* nos diferentes ambientes durante os anos 2002, 2003,2004

4.2.2 Antibiograma

A população de *S. aureus* é observada nos diversos ambientes analisados, e no presente trabalho foram selecionados os isolados que apresentaram resistência a dois antibióticos (gentamicina e amicacina). A distribuição de *S. aureus* e a análise de antibiograma mostram que a distribuição de isolados com resistência a diferentes antibióticos, tais como gentamicina (GM) e amicacina (AK) da classe dos aminoglicosídeo com ponte de corte para interpretações do antibiograma (MIC-$\mu g.ml^{-1}$) resistente entre ≥ 64 para amicacina e ≤16 para gentamicina foi estável no período avaliado. Resultado semelhante foi observado no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), no período de janeiro a junho de

2001, onde foram estudados isolados de *S. aureus* isolados de pacientes, fazendo uma análise do local da infecção e da sensibilidade e resistência dos antimicrobianos, foi observado que todas as amostras testadas apresentaram resistência à penicilina, ampicilina, amoxacilina, cefazolina, cefataxima, cefalotina, tetraciclina e clindamicina; e que a hemocultura foi a amostra que teve maior número de isolados de *S. aureus*, enquanto que os líquidos peritoneal e pleural apresentaram menor freqüência (ZELANTE et al., 1982). De fato em trabalho de suscetibilidade antimicrobiana na cidade de Goiânia (POLETTO et al., 2005), foi demonstrado que há alta sensibilidade de bactérias Gram-negativas a ciprofloxacina e norfloxacina e 74,6% e 72,7% resistentes à amoxicilina e ampicilina, respectivamente.

4.2.3 Caracterização genética de *Staphylococcus aureus*

A análise da diversidade genética de *S. aureus* por ARDRA mostrou a presença de 5 haplótipos nos diferentes ambientes (Figura 6). Entre estes o haplótipo H1 foi o mais freqüente em todas as amostras avaliadas, estando presente em amostras clínicas (pacientes), superfícies e ar condicionado (Figura 7). O haplótipo H3 foi encontrado principalmente em superfícies, enquanto H4 e H5 foram encontrados somente a partir de amostras clínicas (Figura 7), no ano de 2004 (Figura 8).

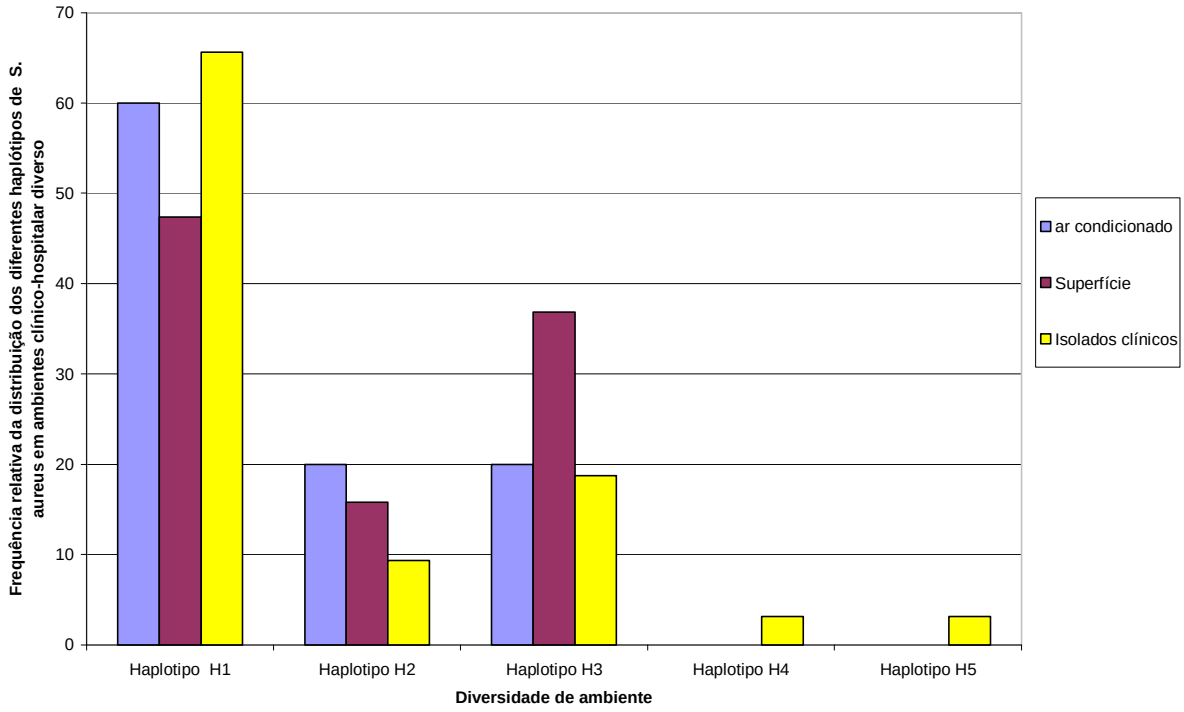

Figura 06. Distribuição dos diferentes haplótipos de *S. aureus* em amostras coletadas no Laboratório e pacientes do Hospital Regional de Ferraz de Vasconcelos, referente ao período de amostragem de 2002; 2003 e 2004. Foram avaliadas 25 amostras de Ar condicionado, 19 de superfície e 32 de pacientes.

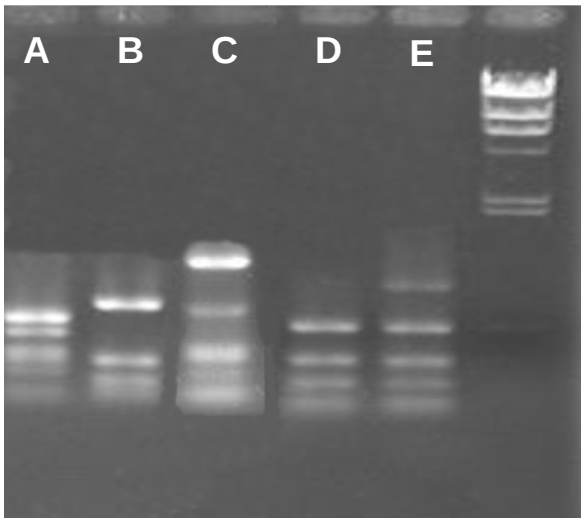

Figura 09. Gel de eletroforese com os haplótipos obtidos pela técnica de ARDRA com a enzima *Mbo*I, dos isolados de *Staphylococcus aureus*. A) Haplótipo H3; B) Haplótipo H4; C) Haplótipo H2; D) Haplótipo H1; E) Haplótipo H5.

Farias et al. (1997) demonstraram a alta taxa de resistência a antimicrobianos nas amostras de *S. aureus* nos hospitais do Brasil, restando poucas opções para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente a oxacilina (ORSA). Como constatado no presente trabalho, a seleção de cepas resistentes poderia ocorrer principalmente devido a essa variabilidade genética em populações de *S. aureus,* as quais parecem ser introduzidas no ambiente hospitalar e posteriormente selecionadas por meio da intensa utilização de antibióticos.

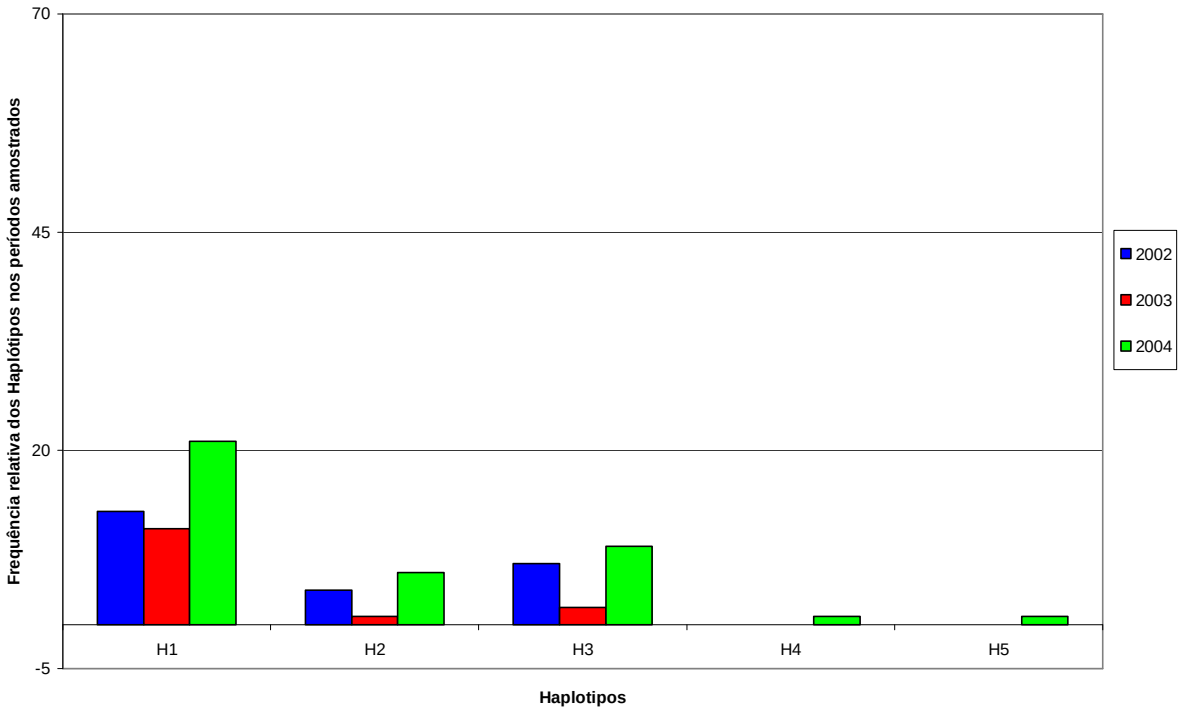

Figura 07. Distribuição dos haplótipos de *S. aureus* nos diferentes períodos amostrados.

A prevalência crescente de diferentes fenótipos em ambiente hospitalar é motivo de preocupação e desafio às práticas de controle de infecção hospitalar (LEMMEN et al., 2004). O grau de contaminação de superfície reflete o padrão de higiene bem como a aplicação das medidas de controle disponíveis sendo influenciado principalmente pela contaminação do ar, que por sua vez está relacionado aos portadores nasais (PASQUARELLA et al., 2000; DANCER et al., 2004).

Foi observado também que os haplótipos H4 e H5 introduzidos somente em 2004, a partir de pacientes, foram isolados de secreção vaginal e da orofaringe, respectivamente, sugerindo que este seja o foco de infecção primária, ou que sejam específicos para estas regiões.

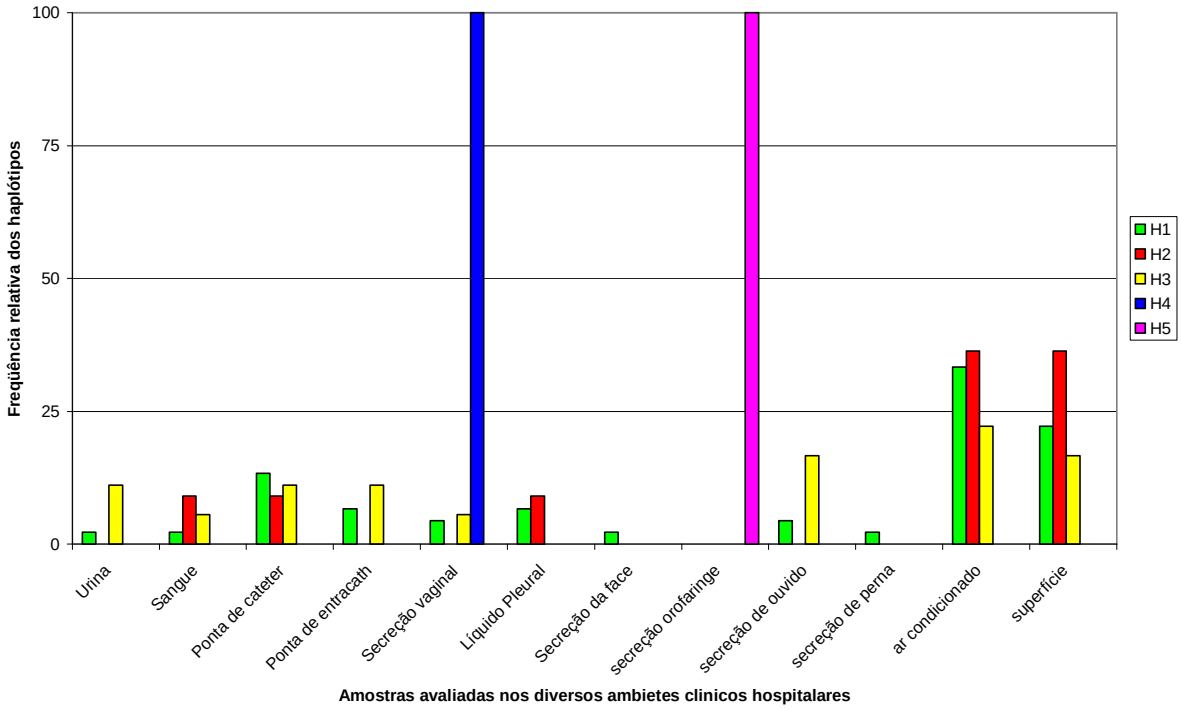

Figura 8: Variação na freqüência relativa das amostras avaliadas nos diversos ambientes clínicos hospitalares com os respectivos haplótipos encontrados no período avaliado de janeiro de 2002 à Dezembro de 2004.

As variações no padrão genotípicos encontradas no presente estudo mostram que, em um determinado ambiente e período, podem existir considerável heterogeneidade genética em populações naturais de *S. aureus* (Figura 9), e que esta variação poderia ser a fonte de variabilidade para que linhagens resistentes possam ser selecionadas por antibioticoterapias inadequadas.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES:

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- *Escherichia coli* apresenta maior freqüência na população de isolados clínicos e de superfície durante o período avaliado, mas não é observado no ar condicionado;
- *Staphylococcus aureus* está presente durante todo o período de avaliação (isolados clínicos, superfície e ar condicionado)
- As provas de sensibilidade a antibióticos demonstram que *S. aureus* presente no ambiente hospitalar é resistente à gentamicina e amicacina;
- Existe variação genotípica na população de *S. aureus;*
- No ano de 2004 foram observados dois haplótipos de *S. aureus* nos pacientes amostrados, encontrados em amostras de secreção vaginal e secreção de ouvido.

REFERÊNCIAS

ALEGRE, J.L. Infecciones nosocomiales em ninõs antecedentes en hospitale del tercer nível de atención. **Revista Médica,** v.6,n.4, p. 497-505, april,2000.

AMERICAN.SOCIETY of Heating, Refrigeration, and Air Conditioning Engineers, Inc. (ASHARE); **Fundamentals Handbook,** Atlanta: ASHARE, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Sistemas de refrigeração, condicionamento de ar e ventilação-Manutenção programada,** NBR 13971. Rio de Janeiro, 1997.

ABSA Commemts Regarding National Committee of Clinical Laboratory Standart NM 29-3A **Protection of Laboratory Workes from Occupationall y- Acquired infection,** a letter written by Setefan Wagener, Ph.D., RBP, CBSP. President ABSA ,5 ,april, 2004.

BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci:* an introduction. **Journal of Applied Bacteriology,**. Symposium. Supplement. v. 69,n 19, p.145-176,october, 1990

BOYCE, J.M. Patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence. I**nfection Control and Hospital Epidemiology,** v.12, p.79-82, february ,1991.

BOYCE, J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology and preventive measures**. Infection Control and Hospital Epidemiology,** v.13, p.725-737, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 35, 23,28 agosto 1998. **Diário Oficial da União,** Brasília, Seção 1, p.40-42, 31 ,agosto, 1998.

BRACHMAN, P.S. Epidemiology of nosocomial infection**.** In: Bennett JV, Brachman PS, eds. **Hospital infections,**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; v26,n 5,p.3-16, September,1998.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-Miller H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***.** New England **Journal of Medicine,** v.320,n 18, p.1188-1196, may,1989.

BUTTNER, P., STECZENBACH, L.D. Monitoring of fungal spores in a experimental indoor environment to evaluate sampling methods and effects of human activity on air sampling. **Applied and Environment Microbiology,** v.59, n 1, p.114-119, 1993.

BUTTNER, M.P.; WILLEKE, K.; GRINSHPUN, S. Sampling for air-bone microrganisms. In: Hurst CJ, Knudsen GR, eds. **Manual of Environmental Microbiology,**. Washington D.C., American Society for Microbiology, p.629-640, 1997.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL (CDC). Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. Morbidity and Mortality. **Weekly Report,** v.46, n.2, p.626-627,november, 1997.

CHAIMOWICZ, FLAVIO. Health of the Brazilian elderly population on the eve of the 21 st century: Current problem, forecast and alternatives**. Revista Saúde Pública,** v.31, n.2, april, 1997.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Review,** v.10, n. 4, p.781-791,october, 1997.

CIMOLAI, N. Outbreaks among newborns: new frontiers in and old dilemma. **American Journal of Perinatology,** v.20,n.3, p.125-136,2003.

CONAMA — Conselho Nacional Meio Ambiente. Resolução nº 3 de 18 junho 1990. Padrões de qualidade do ar**. Diário Oficial da União**, 22, agosto, 1990.

CONNER, J.M.; OLDAKER, III G.B.; MURPHY, J.J. Method for assessing the contribution of environmental tabacco smoke to respirable suspended particles in indoor environments. **Environment Technical,** v.11,n.2, p.189-196,September, 1990.

COSGROVE, S.E., and Y. Carmeli. The impact of antimicrobial resistame health and economic out comes**. Clinical Infectious Disease,** v.36,n.1,p.53-59,january, 2003.

COZAD, A.; JONES, R.D. Disinfection and the prevention of infectious disease. American **Journal of Infection Control,** n.4, v. 31, p.243-254, June, 2003.

DADE BEHRING -MicroScan® Dried Gram Positivo procedual **Manual, DADE BEHRING,** Inc. West Sacramento, CA USA, 2002. Adult Terapy Guide Legend, Dade Behring Inc., Dade MicroScan Inc., West Sacramento CAUSA. 2002.

DANCER, S.J. How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. **Journal of Hospital Infection,** n.1, v.56, p.10-15, January, 2004.

DANTAS, E.H.M. Ar condicionado: vilão ou aliado? Uma revisão crítica**. Revista Brasindoor,** v 2.,n.9, p.4-14, 1998.

DUARTE, D; VERAS, M.A.& MARTINS, J.A. Perfil evolutivo da resistência do Staphylococcus aureus experiência do Hospital Adventista Silvestre. In: **Programa Oficial e Resumo de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro de Infectologia,** Porto Alegre. Resumo n. 91, p. 82, 1994.

FARIAS. W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I.L.; PIGNATARI, A.C. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isolados em 12 hospitais. Laboratório Especial de Microbiologia Clínica. Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – SP; **Revista de Associação Médica**, v.3, n.43 ,p.199-204, october,1997.

FRANCIOLLI, M.; BILLE, J.; GlAUSER, M.P.; MOREILLON, P. β lactamase resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases,** v.163, n.3, p 514-523,1991.

GAYNES, R.; EDWARDS, J.; JARVIS, W. The national nosocomial infections surveillance system: nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. **Pediactrics,** v.98,n.3, p.357-361,September, 1996.

GENIGEORGIS, C. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **Journal of Food Microbiology,** v.9, p.327-360, 1989.

GILLESPIE, W.A.; SIMPSON, K.; TOZER, R. Staphylococcal infection in a maternity hospital: epidemiology and control**. Lancet,** v.2, p.1075-1080, 1958.

GRAHAM, P.L. Staphylococcal and enterococcal infections in the neonatal intensive care unit. **Seminars in Perinatology,** v.26, p. 322-331, april,2002.

GUILHERMETTI, M**.** Effectiveness of hand cleansing agents for removing meticillin- resistant Staphylococcus aureus strain from contaminated hands. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.22, p.105-108, 2001.

HALEY, R.W.; HIGHTOWER, A.W.; KHABBAZ, R.F.; THORNSBERRY, C.; MARTONE, W.J.; ALLEN, J.R.; HUGHES, J.M. The emergence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in United States hospitals. **Annals of Internal Medicine,** v.97,n.3, p.297-308, 1982.

HAMBREAUS, A. Aerobiology in the operating room: a review. **Journal Hospital Infection,** v.11 (Supplement A).p.68-76, 1998.

HARRIES, A.D.; MAHER, D.; NUNN, P. Practical and affordable measures for the protection of the health care workers and patients from tuberculosis in low income countries. **Bull World Heath Organ,** v.75n.5, p.477-489, 1997.

HIRAMATSU, K.;ITO, T, HANAKI, Evolution of methicillin nd glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. In: Finch RG, Willians RJ, eds. Bailliere's clinical in ectious disease. London **Bailliere Tindal,** v.2, p. 21-34, 1999.

HOLT, J.G. Gram-positive cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology,** 9. ed. Baltimore Willians & Wilkins, p.544-551, 1994.

JACOBY, G.A.; ARCHER, G.L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. New England **Journal of Medicine,** v.324, p. 601-612,1991

JACOBY, G.A. Epidemiology of extended-spectrum β-lactamases. **Clinical Infectious Diseases,** v.27, p.81-83, 1998.

JENSEN, P.A. Instrumentation used with microbial bioaerosol. In: Ligthart B, Mohr AJ, eds. Atmospheric microbial aerosols, theory and applications. 1st ed. New York: **Chapman and Hall,** p.226-284, 1994.

KONEMAN, E. W.; ALEN, S.D.; JANDA W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C., Diagnóstico Microbiológico – **Texto e Atlas Colorido**, 5º edição, Rio de Janeiro, Editora MEDSI, p.1465, 2001.

KULSCAR–NETO, F.; SIQUEIRA, L.F.G. Padrões referenciais para análise de resultados de qualidade microbiológica em interiores visando à saúde pública no Brasil. **Revista Brasindoor,** v.2, p.4-20, 1998.

LACEY, R.W. Genetic basis, epidemiology and future significance of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. A review. **Journal of Clinical Pathology,** v.26, p.899-913, december,1973.

LACEY, R.W. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci*.* **British Medical Bulletin,** v.40, n.01, p.77-83, 1984.

LEMMEN, S.W.; HÃFNER, H.; ZOLLDANN,D.; STANZEL, S.; LÜTTICKEN,R. Distribution of mult-resistant Gram-negative versus Gram-positive bactéria in the hospital inanimate environment**. Journal of Hospital Infection**, v.56, p. 191-197, 06,february, 2004.

LEVY, C. E; MONTELLI, A.C.; FURTADO, J.S.M. Resistência a drogas em cepas bacterianas de pacientes de serviços hospitalares: march, 1991.

LEVENSON, S.M.; TREXLER, P.C. Nosocomial infection: prevention by special clean-air, ultraviolet light, and barrier (isolator) techniques (review). Publicação Médica – indexed for Medline. **Current Problems in Surgery,** v.23, p.453-558, julho, 1986.

LIDWELL, O.; ELSON, R.A; LOWBURY, E.J.; WHYTE, W.; BLOWERS, R. STANLY SJ, Lowe D**.** Ultraclean air and antibiotics for prevention of postoperative infection. **Acta Orthopedic Scandinavian,** v.58, n. 01, p.4-13, 1987.

MCDONALD, S. Transduction of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. **Lancet,** v.19, n.2, p.1107-1110,november, 1966.

MAC GOWAN, J.E. Changing etiology of nosocomial bacteremia and fungemia and other hospital-acquired infections. **Review Infect Disease,** v.7 (supplement.3): p.357-370, 1985.

MANTONE, W.J.; JAVIS, W.R.; EDWARDS, J.R.; GULVER, D.H.; HALEY, R.W. Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. In: Bennett J.V., Brachman P.S. **Hospital infections,** 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 461- 467, 1998.

MAPLE, P.A.C.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; BRUMFITT, W. World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet,** v.1, p.537-540, 1989.

MARTINS, ST; MOREIRA, M.; FURTADO, G.H.C. et al. Aplication of control measure for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v99, n. 03, p.331-334,may, 2004.

MENEZES-SILVA, C.R; WATABABE, C.M.; DIOGO , F.A,; GONTIJO, F. P.P.Centros cirúrgicos, uso de antimicrobianos em pacientes cirúrgicos e microflora ambiental nas salas de cirurgia dos hospitais de Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Cirurgia**, 1999.

MERRER, J. ; SANTIOLI, F. ; APPERE de VECCHI C, TRAY B, De JONGHE B, Outin H. Colonization pressure and risk of acquisition of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. **Infection Control Hospital Epidemiology,** v.21, p. 718-723, November, 2000.

MOLAND, E.S.; SANDERS, C.C.; THOMSON, K.; Can Results Obtained wit Commercially MicroScan Microdilution Panels Serve as an Indicator of ß – lacatamase Production among Escherichia coli and Klebsiella isolates with Hidden Resistence to Expanded-Spectrum Cephalosporins and Aztreonam**. Journal of Clinical Microbiology**, v. 36,n.9, p.2575-2579, september,1998

MOREIRA, B.M.; DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in staphylococci. **Pediatric Clinics of North America,** v.42, n. 03, p.619-648, 1995.

MULLIGAN, M.E.; MURRAY-LEISURE, K. A.; RIBNER, B.S**.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. **American Journal of Medicine,** v.94, p.313-325, 1993.

MURRAY, C.J.L; RETHINKING, D. In: MURRAY CJL, LOPES AD, editors. The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability

from diseases, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. **Cambridge: Harvard University Press,** p. 117-200,1996.

MUTO, C.A.; JERNIGAN, J.A.; OSTROWSKY, B.E.; RICHET, M.; JARVIS, W.R.; BOYCE, J.M. Gideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant straisns of staphylococcus aureus and enterococcus**. Infection Control Hospital Epidemiology,** v.24, n. 05, p.362-386, may, 2003.

NAHS, E.; SILVA, P., Bacterial Diversity in Soil in Response to Differente Plants, Phosphate Fertilizers an Fertilizers and Liming**.** Brazilian **Journal of Microbiology**, v.33, p.304-310,june, 2002.

NAMBIAR, S.; HERWAÇDT, L.A; SINGH, N. Outbreak of invasive disease caused by methicilin-resistant *Staphylococus aureus* in neonates an prevalence in the neonatal intensive care unit. **Pediatric Critical Care Medicine,** n.2, v.4, p.220-226, april, 2003.

NICHOLS, R.L. The operating room. In: Bennett JV, Brachman PS, eds. Hospital infections. 4th ed. Philadelphia: **Lippincott-Raven,** p.68-76, 1998.

OTT, W.R.; ROBERTS, J.W. Everyday exposure to toxic pollutants. **Scientific American,** v.278,p.72-77,february, 1998;

PASQUARELLA, C.S.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **Journal of Hospital Infection,** v.46,n.4, p.241-256, december 2000.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; PERIERA, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p. 171-175, may- agosto - 2001.

POLETTO, K.Q., Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** n.5, v. 38 Uberaba, setembro/outubro.2005.

PINTO, C.A.G.; SANTI, L.Q.; SANTOS, A.A.M.; SOUZA, A.P.G.; MELO, V.; BELMOK, T.T.A.; SILVA, E.B.; ROESBERG, J.A,Q.; DESCHAMPS, A.V.M.; PENA, P.M.; PEREIRA, I.D.; Comportamento microbiológico das infecções comunitárias no Hospital Municipal Odilon Behrens (HNOB) jan/94 a dez/95**.** In: **Programa Científico Oficial do IX Congresso Brasileiro de Infectologia**, Recife. Resumo n. 413, p. 184, 1996.

RANGEL, E.; FURTADO, A.; FURTADO, W..; MACEDO, J.; CUNHA Jr. A.C.; MACEDO. V.; MORETTO, D. Avaliação das culturas de secreções do laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB)-DF e do perfil de resistência aos antimicrobianos, de outubro/93 a março/94. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v.28(suplemento1), p. 263,1995.

RHAME, F.S. The inanimate environment. In: Bennett JV, Brachman PS, eds. **Hospital infections,** 2nd ed. Boston: Little, Brown; p. 223-249, 1986.

RHAME, F.S. Nosocomial aspergillosis: how much protection for which patients? **Infection Control Hospital Epidemiology,** v.10, p.296-298, 1989.

RHAME, F.S. The inanimate environment. In: Bennett JV, Brachman PS, eds. Hospital infections. 4th ed. Philadelphia: **Lippincott-Raven**, p.299-324, 1998.

ROBINSON, D.A**.** Evolutionary models of the emergence of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus.* ***Antimicrobial*** **Agents Chemotherapy** v.47, p.3926 – 3934,December,2003

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Should we routinely disinfect floor? **Journal of Hospital Infection,** n.4, v.51, p. 309 -311, Letters to the Editor. August 2002.

SADER, H. Resistência bacteriana. Fascículo 1. **Laboratórios Pfizer,** São Paulo, 1998.

SALOMÃO, R; CASTELO, A.; PIGNATGARI A.C.C.; WEY,S.B. Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. **Revista Paulista de Medicina,** v.111, p. 456-461,1993.

SANTOS FILHO, L.; FREITAS, F.I.S.; SIQUEIRA Jr, J.P. Evolution of drug-Resistance in *Staphylococcus aureus* from a Brazilian university hospital. **Folha Médica,** (Br) v.108, p.101-103, april, 1994.

SAUNDERS, J.R. Genetics and evolution of antibiotic resistance**. British Medical Bulletin,** v.40, p.54-60, January,1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T., Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, New York. 23,November,1989.

SATYASEELA, M.P.; BELKUN, A.; SHIVANNAVER, C.T.; FADDA, S.M. Carriage of capsulated strains of *Staphylococcus aureus*: a population-based study performend in Gulbarga, South India. **Epidemiology and Infection,** v.132, p.831-838, 2004.

SCHWALBE, R.S.; STAPLETON, J.T.; GILIGAN, P.H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. New England **Journal of Medicine,** v.316, n.15, p.927-930, 1987.

SPAUDING, E.H. Chemical disisnfection of medical and surgical material. In: BLOCK, S.S. (eds) Disinfection, sterilization and preservation. **Lea & Febiger,** Philadelphia**,** p.517-531, 1968.

STECZENVBACH, W.R.; HUST, C.J.; KNUSDEN, G. Dispersal of fungal spores from contamined metal and fiberglass duct. Engineering solutions to indoor air quality, air and wastre management assoc. **Research Triangle Park,** p.21-23, july 1998.

SHLAES, D.M.; GERDING, D.N.; JOHN Jr, J.F.; CRAIG, W.A.; BORNSTEIN, D.L.; DUNCAN, R.A.; ECKMAN, M.R.; FARRER, W.E.; GREENE, W.H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN Jr, J.E.; PAUL, S.M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F.C.; WATANAKUNAKORN, C. Society of Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committe on the Prevention of Antimicrobial Resistance. Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. **Clinical Infectious Diseases,** v.25, p.584-599, 1997.

STECZENBACH, L.D. Microrganisms and indoor air quality. **Clinical Microbiology Newsletter,** p.157-161, 1988.

STREIFEL, R.J**.** Design and maintenance of hospital ventilation systems and the prevention of airbone nosocomial infection**.** In: Mayhall CG, ed. Hospital epidemiology and infection control. 1st ed. **Baltimore:** William & Wilkins; p.955-963, 1996.

SUASSUNA, I. Noções gerais e incidência da resistência bacteriana. In: Gomes AJ (Ed.) **Simpósio Internacional sobre Resistência Bacteriana e Infecções Mistas**, São Paulo, 1982. Anais. São Paulo, Unipress, 14,may,1983.

THOMSON, K.S.; SANDERS, C.C; MOLAND, E.S., Use of Microdilution Panels with and without β - Lactamase Productions among *Escherichia coli, Klebsiella*

spp., *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii, and Serratia marcencens.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy ,** v. 43,n.6, p.1393-1400, june,1999.

TOUFEN JR, C; HOVNANIAN, A.L.D; FRANCA, S.A.Prevalence rates infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Paulista de São Paulo,** v.58,n.5, p.254-259, 2003.

TRABULSI, L.R. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. **Revista de Microbiologia,** (São Paulo) (suplemento especial),p.1-30, 1973.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C., Generalidades sobre *Staphylococcus***.** In: Trabulsi, L. R; ALTERTHUM F.; GOMPARTZ, O. F, CANDEEIRAS, J. A, (Ed.) **Microbiologia**, 3º Edição, São Paulo, Editora Ateneu, cap. 27, 1999.

UBUTAKA, K.; YAMASHITA, N.; KONNO, M**.** Occurrence of a ß-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v.27,n.5, p.851-857, may,1985.

WALDVOGEL, F.A. New resistance in *Staphylococcus aureus***. New England Journal of Medicine**, v.340,n 7,p.556-557, 1999.

WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. **Clinical Infectious Diseases,** v.27 p.245-251, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Indoor air quality: Biological Contaminants. **Rautavara**,28,agost, 1998.

ZELANTE, F.; ASHCAR, H.; PIOCHI, B.J.A. *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos são: verificação de identidade entre as cepas isoladas. **Revista de Saúde Pública**, v16,n2, p.92-96. ISSN 0034-8910, abril 1982.

ZULIANI, M.E. **Resistência microbiana a drogas,** Ars Curandi v.5, p.50- 72, 1972.

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